

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Açıklamalı [A1]:

**TAVİANLARDA AMNİYOTİK SIVI VE PLASENTA
MEMBRANIN KEMİK İYİLEİMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Xhini RİZAJ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nergiz YILMAZ

2023- İZMİR

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**TAVİŞNLARDA AMNİYOTİK SIVI VE PLASENTA
MEMBRANIN KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Xhini RİZAJ

DOKTORA TEZİ

DANIİMAN
Prof. Dr. Nergiz YILMAZ

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2022-TDR-SABE-0007 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2023- İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüt Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /

Tez Danışmanı:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan doktora tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezimin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- **Tezimin 24/01/2024 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

- **Tezimin 24/01/2024 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

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

Xhini Rizaj

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez danışmanım Prof. Dr. Nergiz Yılmaz danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

.../.../...

Xhini Rizaj

TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimim sürecinde benden desteğini hiç esirgemeyen, yol gösteren, tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde katkısı olan ve her zaman yanımda olan kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nergiz Yılmaz'a;

Tezimin histolojik incelemelerinin yapılmasında büyük yardımları ve emeği olan, desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma Şimşek'e;

Doktora eğitimim süresince pratik ve teorik anlamda bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Prof. Dr. Gülten Kavak, Doç Dr. Murat Ulu ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Akçay, Doç. Dr. Nihat Laçın, Doç. Dr. Onur Şahin'e;

Doktora eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili Ağız Diş ve Çene cerrahisi asistan arkadaşlarıma, özellikle Dilan Kaya _ya.

Tezimin deneysel bölümünün gerçekleştirilmesinde emeği olan asistan arkadaşlarım Eynar Berdeli, Çiğdem Kara Kaya, Malik Bayramov, Oya Törün ve Mustafa Can Akar'a;

Hayatım boyunca ve doktora eğitimim sürecinde maddi ve manevi her zaman yanımda olan sevgili annem Mimoza Xhafa, babam Arben Rizaj abim Jurgen Rizaj ve kız kardeşim Sara Rizaj'a;

Tez sürecinde de her gün desteğini hissettiğim Adi Hoxha ve Iglia Hoxha'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Xhini Rizaj, TavŞanlarda Amniyotik Sıvı Ve Plasenta Membranının Kemik İyileŞmesi Üzerinde Etkisinin Değerlendirilmesi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız DiŞ ve Çene Cerrahisi Doktora Programı, Doktora Tezi, İzmir, 2023

Amaç: Bu çalışmada tavŞanlarda amniyotik sıvı ve plasenta membranının kemik iyileŞmesi üzerinde etkisini incelemeyi amaçladık.

Materyal - Metod: Çalışmada 24 adet Yeni Zelanda tavŞanı kullanıldı. Toplam 24 tavŞan; Sayı, cinsiyet ve sakrifikasyon sürelerine göre, Grup I (n=12; 6 diŞi 6 erkek) erken kemik iyileŞme grubu, Grup II (n=12;6 diŞi 6 erkek) geç iyileŞme grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Her tavŞanın iki parietal kemiğine 6 mm çaplı 1.0-2.0 mm derinliğinde dairesel 4 adet kritik boyutta defekt hazırlandı. Defektlere göre; Grup I (n=24) serum & xenogreft (kontrol) grubu, Grup II (n=24) amniyotik sıvı & xenogreft grubu, Grup III (n=24) amniyotik plasental membran & xenogreft grubu, Grup IV (n=24) amniyotik sıvı & amniyotik plasental membran & xenogreft grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. TavŞanların yarısı 4. hafta diğer yarısı ise 12. haftada sakrifiye edildi. Alınan örnekler histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. İmmünohistokimyasal olarak Alkalen fosfataz (ALP) ve Osteokalsin (OCT) ekspresyonlarına bakıldı. Yeni kemik oluşumu incelendiğinde hem 4. hafta hem de 12. hafta sonuçlarında kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü.

Sonuç: Histopatolojik incelemeler sonucunda kısa dönem örneklerde erken gruplar arasında kemikleŞme oranı en iyi olan grubun erken amniyotik sıvı amniyotik plasental membran grubu olduğu görülmüştür. Geç dönem örneklere göre kemikleŞmenin en iyi gerçekleŞtiği grup geç plasenta grubudur.

Anahtar Kelimeler: Kemik rejenerasyonu, Kalvarial kemik defekti, Amniyotik sıvı, Plasenta

ABSTRACT

Xhini Rizaj, Evaluation of the Effect of the Amniotic Fluid and Placenta Membrane on Bone Healing in Rabbits, İzmir Katip Çelebi University Institute of Health Science, Oral and Maxillofacial Surgery Doctoral Program, Doctoral Thesis, İzmir, 2023

Aim: In this study, we aimed to examine the effects of amniotic fluid and placental membrane on bone healing in rabbits.

Material-Method: 24 New Zealand rabbits were used in the study. A total of 24 rabbits were divided into 2 groups, Group I (n=12; 6 females, 6 males) early bone healing group and Group II (n=12; 6 females, 6 males) late healing group according to their number, sex, and saccharification times. Four critical size circular defects of 6 mm diameter and 1.0-2.0 mm depth were prepared in the two parietal bones of each rabbit. According to the defects they were divided into 4 groups; Group I (n=24) serum & xenograft (control) group, Group II (n=24) amniotic fluid & xenograft group, Group III (n=24) amniotic placental membrane & xenograft group, Group IV (n=24) amniotic fluid & amniotic placental membrane & xenograft group. Half of the rabbits were sacrificed in the 4th week and the other half in the 12th week. The samples were examined histologically and immunohistochemically. Alkaline phosphatase (ALP) and Osteocalcin (OCT) expressions were examined immunohistochemically. When the new bone formation was examined, a statistically significant difference was observed between the control group and the other groups in the results of both the 4th and 12th weeks.

Conclusion: As a result of histopathological examinations, it was seen that the group with the best ossification rate among the early groups in short-term samples was the early amniotic fluid+placenta group. Compared to the late-term samples, the group with the best ossification was the late placenta group.

Keywords: Bone healing, Calvarial defect, Amniotic fluid, Placenta

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	I
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEİEKKÜRLER.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
Simgeler ve Kısaltmalar.....	IX
İekiller Dizini	XII
Tablolar Dizini.....	XIII
Resimler Dizini	XIV
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kemik Dokusu.....	3
2.2 Kemik Hücreleri	4
2.2.1 Oteoblastlar	5
2.2.2 Kemik örtücü hücresi (bone lining).....	7
2.2.3 Osteositler.....	7
2.2.4 Osteoklastlar.....	8
2.3 Kemik Matriksi.....	9
2.3.1 İnorganik Matriks	9
2.3.2 Organik Matriks.....	10
2.4 Periosteum ve Endosteum	10
2.4.1 Periosteum	10
2.4.2 Endosteum.....	11
2.5 Osteogenezis (Kemik Gelişimi)	11
2.5.1 İntramembranöz Kemikleşme	11
2.5.2 Endokondral Kemikleşme.....	12
2.6 Kemik İyileşmesi	13
2.6.1 İnflamatuar Faz	15
2.6.2 Reperatif Faz	16
2.6.3 Remodelling Fazı.....	17
2.7 Kemğin metabolik rolü.....	17

2.8 Kritik Boyutlu Kemik Defektleri	18
2.9 Kemik Greftleri ve Kemik Yerine Geçebilen Biyomateryaller	19
2.9.1 Otojen Greftler	22
2.9.2 Allogreftler (Homogreftler)	23
2.9.3 Ksenogreftler (Heterogreftler)	24
2.9.4 Alloplastik Greftler (Sentetik Greftler)	25
2.10 Amniyotik sıvı ve plasenta	28
2.10.1 Amniyotik Sıvının Gelişim Biyolojisi ve Plasenta	29
2.10.2 Amniyotik Sıvıdan ve Plasentadan Elde Edilen Hücreler	30
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1 Çalışma Grupları	33
3.2 Cerrahi Protokol	34
3.2.2. Amniyotik sıvının preparasyonu	43
3.3 Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler	44
3.3.1. Rutin Doku Takibi	44
3.3.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü	44
3.4 İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1 Histopatolojik Bulgular	47
4.2 İmmünohistokimyasal bulgular	54
5. TARTIIMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80
EKLER	95
ÖZGEÇMİŞ	96

Simgeler ve Kısaltmalar

- AFSC:** Amniyotik sıvı kök hücreleri
- ASC:** Adiposedan türenmiş stromal hücreleri
- BAG:** Biyoaktif camlar
- BFSC:** Bukkal yağ kök hücreleri
- BM-MSC:** Kemik iliği mezenşimal kök hücre
- BMP:** Kemik morfogenetik proteini
- BMSC:** Kemik iliği stromal hücre
- BMU:** Temel çok hücreli birim
- BSP:** Kemik sialoprotein
- CCL2:** C-C motif kemokin
- CPC:** Kalsyum fosfat siman
- CTR:** Sadece skafold
- CXCL:** C-X-C kemokin ligand
- DAM:** Hücesizleştirilmiş insan amniyotik membran
- DDBB:** Deproteinize kansellöz sıgır kemiği
- DDKKG:** Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik grefti
- DDM:** Demineralize dentin matriksi
- DGP:** Dentin glikoprotein
- dk:** Dakika
- DKG:** Dondurulmuş kemik grefti
- DKKG:** Dondurulmuş kurutulmuş kemik grefti

d-PTFE: Yoğun politetrafloroetilen

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FHAM: Taze insan amniyotik membran

HA: Hidroksiapatil

hAEC: İnsan amniyotik endotelial hücresi

HAM: İnsan amniyotik membran

HCl: Hidroklorik asit

HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü

HNO₃: Nitrik asit

IFN- γ : İnterferon- γ

IL: İnterlökin

İL: İnterlökin

M: Mol

M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör

MCSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör

ml: Mililitre

mm: Milimetre

MSC-CM: Mezenşimal kök hücreleri-hücre modeli

NaOH: Sodyum hidroksit

OCN: Osteokalsin

OPN: Osteopontin

PDDM: Parsiyel demineralize dentin matrisi

PDGF: Trombosit

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PMMA: Polimetil metakrilat

PMN: Polimorfonükleer lökosit

PRP: Trombositten zengin plazma

PTH: Paratiroid hormon

PTH: Paratiroid hormonu

RANKL: Nükleer faktör kappa betanın reseptör aktivatörünün ligandı

RANKL: Nükleer faktör kappa betanın reseptör aktivatörünün ligandı

RER: Granular endoplazmik retikulum

rPT: Hızlı prototipleme

SDF 1: Stromal hücre kaynaklı faktör 1

TCP: Trikalsiyum fosfat

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü beta

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

tMFG: Temporal kas -fasya grefti

TNF: Tümör nekroz faktör

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

μ m: Mikrometre

TCP: Beta trikalsiyum fosfat

%: Yüzde

$^{\circ}$ C: Santigrat derece

İekiller Dizini

İekil 1 Kemik hücreleri (5).....	4
İekil 2 Kemigin yileŖme aŖamalarının gösterimi (15).....	15
İekil 3 Kemik greftin ve membranin kemik defektinde yerleŖmesi.....	21
İekil 4 Kök hücre kaynağı olarak gebelik dokusu.....	32
İekil 5 4. Hafta kemikleŖme ölümlerinin gruplara göre dağılımı.....	50
İekil 6 12. Hafta kemikleŖme ölümlerinin gruplara göre dağılımı.....	53

Tablolar Dizini

Tablo 1 İmmünohistokimyasal skorlamanın gösterilmesi	46
Tablo 2 Erken gruplarının hematoksilin-eozin boyamalarında greft, bağ doku ve yeni kemik oranlarının karşılaştırılması	49
Tablo 3 Geç gruplarının hematoksilin-eozin boyamalarında greft, bağ doku ve yeni kemik oranlarının karşılaştırılması	52
Tablo 4 Erken gruplarının IHC boyamaları.....	56
Tablo 5 Geç gruplarının IHC boyamaları.....	59

Resimler Dizini

Resim 1 TavŞan kafa derisi traŞ edildikten sonra alınan görüntü.....	35
Resim 2 Kafa derisi insizyonu ve paryetal kemiğin görüntüsü	36
Resim 3 Hazırlanan defektlerin görüntüsü	36
Resim 4 Deney gruplarının görüntüsü (sol üst defekt: serum+ksenogreft, sol alt defekt: amniotik plasental membran+ksenogreft, sağ alt defekt: amniotik sıvı+amniotik plasental membran+ksenogreft, sağ üst defekt: amniotik sıvı+ksenogreft	37
Resim 5 Periostun 4-0 emilebilen suture ile suture edilmiŞ görüntüsü	37
Resim 6 Kafa derisinin 3-0 emilebilen suture ile kapatılması.....	38
Resim 7 Plasentanın serum fizyolojik ile yıkanması	39
Resim 8 Amniyotik membran koryon tabakasından ayrılması.....	39
Resim 9 Amniyotik membranın solüsyonda bekletilmesi	40
Resim 10 Amniyotik membranın çıkarılması	41
Resim 11 Steril örtüde bulunan amniyotik membran	42
Resim 12 Nitrosellüloz kağıt örneği	42
Resim 13 Petri kabında dondurucuya girmeye hazır membranlar.....	43
Resim 14 Amniotik sıvı preparatı	43
Resim 15 Erken serum; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız:havers kanallarını, *:howship lakünası içindeki osteoklastı göstermektedir (H&E; x4, x10).....	47
Resim 16 Erken amniyotik sıvı; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok :osteoblast, yeŞil ok:osteoprogenitör hücreleri göstermektedir (H&E; x4, x10).	47
Resim 17 Erken amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok:osteoblast, yeŞil ok :osteoprogenitör hücreleri, siyah ok: inflamasyon odağını, yıldız :havers kanalını göstermektedir (H&E; x4, x10).	48
Resim 18 Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok :osteoblast, yeŞil ok: osteoprogenitör	

hücreleri, siyah ok: inflamasyon odağını, yıldız: havers kanallarını, *: howship lakünası içindeki osteoklastı göstermektedir.....	48
Resim 19 Geç serum; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yeşil ok: osteoprogenitör hücreleri göstermektedir (H&E; x4, x10).....	50
Resim 20 Geç amniyotik sıvı; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok :osteoblast, yeşil ok :osteoprogenitör hücreleri, yıldız: havers kanallarını, *: howship lakünası içindeki osteoklastı göstermektedir (H&E; x4, x10).....	51
Resim 21 Geç amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok :osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız :havers kanalını göstermektedir (H&E; x4, x10).	51
Resim 22 Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok :osteoblast göstermektedir (H&E; x4, x10).	52
Resim 23 A: Erken serum, B: Erken amniyotik sıvı, C: Erken amniyotik plasental membran, D: Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok :osteosit, kırmızı ok :osteoblast, yıldız :havers kanallarını göstermektedir (IHC ALP, x10).	54
Resim 24 A: Erken serum, B: Erken amniyotik sıvı, C: Erken amniyotik plasental membran, D: Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok :osteosit, kırmızı ok :osteoblast, yıldız: havers kanallarını göstermektedir (IHC OCT, x10).	55
Resim 25 A: Geç serum, B: Geç amniyotik sıvı, C: Geç amniyotik plasental membran, D: Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok :osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız :havers kanallarını göstermektedir (IHC ALP, x10).	57
Resim 26 A: Geç serum, B: Geç amniyotik sıvı, C: Geç amniyotik plasental membran, D: Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız :havers kanallarını göstermektedir (IHC OCT, x10).....	58
Resim 27 Negatif kontrol (IHC, X10)	59

1.GİRİİ

Oral cerrahide kemik kayıplarının rekonstrüksiyonunda çeŞitli augmentasyon teknikleri uygulanmaktadır. Bu amaçla kullanılan greftler yeni kemik oluşumunun daha hızlı ve daha kaliteli kemik oluşumuna destek olduğu düşünölmektedir. Kemik greftlerinden, otojen greftler hala altın standart olarak geçse de donör saha morbiditesi, hızlı rezorbsiyon ve sınırlı miktarda greft elde edilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle çeŞitli alternatifler geliştirilmiştir. Xenojenik (hayvan kaynaklı) kemik greftleri bunların içinde en sık kullanılan, biyouyumlu ve osteokondüktif özellikte bir greft çeŞididir. Üretim aşamasında blok ve partiköl gibi çeŞitli formlarda üretilebilmekle beraber oral ve maksillofasiyal cerrahide çoğunlukla tercih edilen formu partiköl olanıdır (1).

Plasentanın en iç tabakası olan amniyotik zar, oldukça bol ve kullanılabilir bir dokudur. İnsan amniyotik membranı (HAM), rejeneratif tıpta başlangıçta yara bakımı ve oftalmolojide kullanılan dikkat çekici bir malzeme olarak kabul edilmesine neden olan önemli avantajlı özelliklere sahiptir.

İnce bir epiteli ve anjiyojenik büyüme faktörleri, sitokinler ve kollajen tip I ve IV, elastin, laminin ve fibronektin gibi diğer aktif maddeleri içeren vasküler olmayan bir stromaya sahiptir.

Plasentadaki ana hücre popölasyonu olan İnsan Amniotik Endotelial Hücreleri (hAEC), yüksek osteojenik farklılaşma potansiyeli gösterir (2).

İnsan amniotik sıvısı çeŞitli büyüme faktörleri ve hyaluronik asit içermektedir. Tendon, sinir ve kemik yaralanmalarının iyileşmesi üzerine pozitif etkiye sahiptir. İnsan amniotik membranı da tendon ve sinir iyileşmesi üzerine etkili olmakla birlikte yanık ve kompleks yaralarda deri iyileşmesi üzerine de pozitif etkiye sahiptir (3, 4, 1).

Literatüre dayanarak amniyotik sıvı ve amniyotik plasental membranın kemik ve kırıldak iyileşmesinde etkili olduğunu destekleyen yayınlar bulunmaktadır. Erişebildiğimiz bir çok çalışmada amniyotik sıvı ilgili bölgeye enjekte ederek veya lokal olarak uygulamışlardır. Bizim çalışmamızda greftin daha kaliteli kemik oluşumuna desteğine ek olarak amniyotik sıvının ve amniyotik plasental membranın kemik iyileşmesi ve anjiogenezise pozitif etkilerinin bir araya getirilmesi planlanarak

daha etkili sonuç alacağımız düşünölmüştür. Amniyotik sıvı ve amniyotik plasental membranın greftle karıştırılarak defektlere uygulanmasının kemik iyileşmesine etkisi ilk kez bizim çalışmamızda değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda osteokondaktif özellikte olan aynı partikül boyutundaki sığır kaynaklı kemik grefti (xenogreft)'ne ilave edilen amniyotik sıvı ve amniyotik plasental membranın anjiogeneze ve yeni kemik oluşumuna etkisi histolojik ve imünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Çalışmamızda amniyotik sıvı, amniyotik plasental membran, sığır kaynaklı kemik greftinin birlikte uygulanması klinik şartlarda kullanım imkânı sağlayan, standardize, kolay ve yeni bir yöntem geliştirme olasılığı olduğu düşünölmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Dokusu

Kemik, dört tip hücre sergileyen mineralize bir bağ dokusudur: osteoblastlar, kemik astar hücreleri, osteositler ve osteoklastlar (5). Kemik vücutta hareket, yumuşak dokuların desteklenmesi ve korunması, kalsiyum ve fosfat depolanması ve kemik iliğinin barınması gibi önemli işlevleri yerine getirir. (6) İnert görünümüne rağmen kemik, osteoklastlar tarafından sürekli olarak rezorbe ve osteoblastlar tarafından yeniden şekillenen oldukça dinamik bir organdır. Osteositlerin bu kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinin mekanosensörleri ve düzenleyicileri olarak hareket ettiğine dair kanıtlar vardır (7). Kemik astar hücrelerinin(bone-lining) işlevi tam olarak net değildir, ancak bu hücrelerin kemik rezorpsiyonunu kemik oluşumuna bağlamaya önemli bir rol oynadığı görülmektedir (8).

Kemik yeniden şekillenmesi oldukça karmaşık bir süreçtir. Üç aşamadan oluşan bir döngüde eski kemiğin yerini yeni kemik alır: osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunun başlatılması, resorpsiyondan yeni kemik oluşumuna geçiş (veya geri dönüş dönemi) ve osteoblastlar tarafından kemik oluşumu. Bu süreç, birlikte temel çok hücreli birim (BMU) olarak adlandırılan geçici anatomik yapıyı oluşturan osteoklastların, osteoblastların, osteositlerin ve kemik astar hücrelerinin koordineli eylemleri nedeniyle oluşur (9). Normal kemik remodelingi, kırık iyileşmesi ve iskeletin mekanik kullanıma adaptasyonu ve ayrıca kalsiyum homeostazı için gereklidir. Kemik rezorpsiyonu ve oluşumdaki bir dengesizlik, çeşitli kemik hastalıklarına neden olur. Örneğin, osteoklastlar tarafından aşırı rezorpsiyon olunca ve bunun karşılığında osteoblastlar tarafından yeterli miktarda yeniden kemik oluşmazsa, kemik kaybı ve osteoporoza sebep olur, bunun tersi osteopetroz ile sonuçlanabilir. (3, 4, 10)

Bu nedenle, kemik oluşumu ve rezorpsiyon arasındaki denge gereklidir ve hormonlar, sitokinler, kemokinler ve biyomekanik stimülasyon dahil olmak üzere çeşitli lokal ve sistemik faktörlerin etkisine bağlıdır (11). Son çalışmalar, kemiğin diğer

organların aktivitesini etkilediğini ve kemiğin vücudun diğer organ ve sistemlerinden de etkilendiğini göstermiştir.

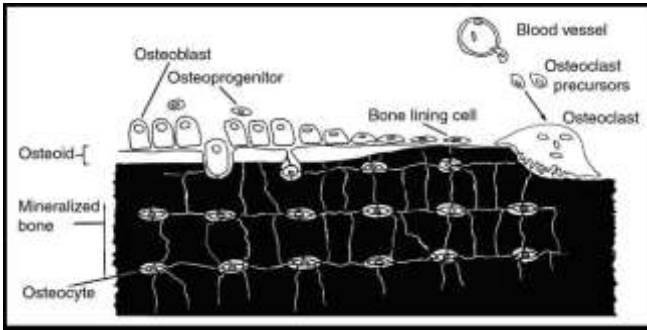
Araştırmalar yeni anlayışlar sağladı ve kemik dokusunun karmaşıklığını ve dinamik yapısını kanıtladı (12). Kemik, kalsifiye hücre dışı materyal, kemik matrisi ve üç ana hücre tipinden oluşan özel bir bağ dokusudur.

2.2 Kemik Hücreleri

Kemik hücrelerinin farklılaşması kökenlerine dayanır. Osteoblastlar, osteositler ve kemik örtücü hücreleri, osteoprogenitör hücreler olarak bilinen mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanırken, osteoklastlar hemopoietik kök hücrelerden kaynaklanır.

Kemiğin hücresel elemanları:

- Kemik örtü hücresi (bone-lining)
- Osteoblastlar
- Osteositler
- Osteoklastlar.(12)



Şekil 1 Kemik hücreleri (5)

2.2.1 Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik iliği, endosteum, periosteum ve kemik kanallarında bulunan farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden türetilir. –Preosteoblastlar olarak da adlandırılan bu hücreler, çevre dokulardan veya vasküler sistemden göç edebilir. Mezenkimal hücreler yıldız şekindedir, nispeten az miktarda sitoplazma ve organel içerir ve tek bir çekirdeğe sahiptir. Mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşması ve proliferasyonu hem intramembranöz hem de endokondral kemik oluşumu sırasında meydana gelir. (5, 13, 14).

Elektron mikroskopunun gelişiyile, osteoblastın yapısı daha belirgin hale geldi. Bu sağlam hücreler, kemiğin yüzey örtüsü boyunca sıkıca paketlenir. Aktif olduklarında, osteoblastlar ovaldir ve büyük miktarlarda granüllü endoplazmik retikül, mitokondri ve Golgi cisimcikleri içerir. Tek çekirdekleri hücrenin merkezinde bulunur. Bu hücrelerde bulunan diğer mikroskopik bileşenler mitokondri, mikrotübüller, mikrofilamentler, lizozomlar, glikojen ve lipidleri içerir. Fonksiyonel olarak osteoblast, proteinler ve polisakkaritlerden oluşan organik matriksin üretiminden sorumludur. (4, 10, 15).

Osteoblastların, paratiroid hormonu ve lokal sitokinlerin etkisi altında, osteoklastları aktive eden araçları salgıladına dair kanıtlar mevcuttur (5).

Osteoblastlar, tip I kollajen lifleri, proteoglikanlar ve osteonektin kemik matriksinin organik bileşenlerini üretir. Kemiğin inorganik bileşenlerinin birikmesi de osteoblast aktivitesine bağlıdır. Aktif osteoblastlar, kemik matriksinin yüzeylerinde bulunurlar ve yüzeye integrinlerle bağlanırlar.

Adeziv ve gap bağlantılarıyla birleştirilen tek bir küboidal hücre tabakası oluştururlar.

Sentetik aktiviteleri tamamlandığında, bazı osteoblastlar matrikse bağlı lakünlerde tutulan osteositler olarak farklılaşır, bazıları düzleşir ve matriks yüzeyini kemik örtücü hücreleri olarak kaplar ve çoğunluğu apoptoza uğrar. Matriks sentezi ve kalsifikasyon süreçleri sırasında osteoblastlar, aktif protein sentezi ve salgılanmasını gösteren ultrastrüktürel özelliklere sahip polarize hücrelerdir. Matriks bileşenleri, mevcut kemik matriksi ile temas halinde hücre yüzeyinde salgılanır ve osteoblast tabakası ile önceden

var olan kemik yüzeyi arasında osteoid adı verilen benzersiz bir kolajen bakımından zengin malzeme tabakası üretir. Bu kemik apoziyonel büyüme süreci, kalsiyum tuzlarının yeni oluşan matris içine yerleştirilmesiyle tamamlanır.

Matris mineralizasyonu süreci tam olarak anlaşılmamıştır. Osteoblastlar tarafından salgılanan kollajen olmayan proteinler arasında öne çıkan K vitaminine bağlı polipeptidosteokalsindir. Çeşitli glikoproteinlerle birlikte Ca^{2+} iyonlarını bağlar ve bu minerali lokal olarak konsantre eder. Osteoblastlar ayrıca alkalın fosfataz açısından zengin membranla çevrili matris vezikülleri ve diğer enzimleri serbest bırakır. Böylece PO_4^{3-} iyon konsantrasyonunu yükselir. Bu iyonların her ikisinin de yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu mikroçevrede, matris veziküller, kalsifikasyonun ilk görünür adımı olan hidroksiapatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] kristallerinin oluşumu için odak görevi görür. Bu kristaller, daha fazla mineralin birikmesiyle hızla büyür ve sonunda kolajen lifleri ve proteoglikanları içine alan birleşik bir kalsifiye malzeme kütlesi üretir. Osteoblastlar, kemik matriksine bitişik uçlarından tip I kollajen, birkaç glikoprotein ve proteoglikan salgırlar. Bu faktörlerin bazıları, özellikle osteokalsin ve belirli glikoproteinler, Ca^{2+} 'ı yüksek afinite ile bağlar ve bu iyonların lokal konsantrasyonunu yükseltir (3, 4, 10, 13, 14).

Osteoblastlar ayrıca alkalın fosfataz ve diğer enzimleri içeren çok küçük zarla çevrili matris vezikülleri serbest bırakır. Bu enzimler, çeşitli matris makromoleküllerinden PO_4 iyonlarını uzaklaştırarak, bu iyonların lokal olarak yüksek bir konsantrasyonunu oluşturur. Yüksek Ca^{2+} ve PO_4 iyon konsantrasyonları, matris veziküllerin içinde ve çevresinde kalsifiye nanokristallerin oluşmasına neden olur. Kristaller, kollajen liflerini ve diğer tüm makromolekülleri çevreleyen kalsiyum hidroksiapatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] kütlelerinin oluşumu ile daha da büyür ve mineralize olur. Doğrudan kemik hücrelerinden kaynaklanan kanser (birincil kemik tümörü) oldukça nadirdir (tüm kanser ölümlerinin %0,5'i), ancak osteosarkom adı verilen bir kanser osteoprogenitör hücrelerde ortaya çıkabilir (4, 10, 15).

2.2.2 Kemik örtücü hücresi (bone lining)

Osteoblastlar 3 yoldan birini takip eder. Bu hücreler (16) aktif osteoblastlar olarak kalabilir (5), matriks ile çevrenip osteositler haline gelebilir veya nispeten inaktif hale gelebilir ve kemik örtücü hücreleri oluşturabilir (13).

Kemik örtücü hücreleri, olgun iskeletteki çoğu kemik yüzeyini kaplayan ince, uzun hücrelerdir. Sitoplazmik uzantılar veya boşluk bağlantıları genellikle onları birbirine veya osteositlere bağlar. Metabolik olarak inaktif oldukları için kemik örtücü hücreleri, osteoblastlardan daha az organel ve daha az sitoplazma içerir. Bazen bunlara -dinlenme osteoblastları veya -yüzey osteositleri denir (5, 13, 14, 16).

Araştırmacılar hala bu hücrelerin işlevi hakkında spekülasyonlar yapmaktadır. Paratiroid hormonunun varlığında, bu hücrelerin, kemiğin osteoklastik olarak rezorbe olmasına hazırlık olarak kemik matrisinin osteoid örtüsünü kaldıran enzimler salgıladıklarını belirtmişlerdir (5).

Diğer yazarlar (6,8) kemik örtücü hücrelerinin osteoblastlar için öncül olabileceğini, kemikteki kristal büyümesini düzenleyebileceğini veya hücre dışı sıvı ile kemik arasında bir bariyer olarak işlev görebileceğini bildirmiştir.

2.2.3 Osteositler

Bahsedildiği gibi, bazı osteoblastlar salgıladıkları materyalle çevrenir ve daha sonra mineralize matris boyunca boşluklar içinde osteositler olarak farklılaşır. Osteoblastlardan osteositlere geçiş sırasında, hücreler birçok dendritik uzantı yayıyor ve bunlar aynı zamanda kalsifiye matriks ile çevrenir. Böylece uzantılar, her bir lakünden yayılan 250300 nm çapındaki birçok kanalcıkları işgal eder (17).

Osteositler ve kan damarları arasındaki metabolitlerin difüzyonu, kemik matrisi ile osteositler ve prosesleri arasında kanaliküllerdeki az miktarda interstisyel sıvı yoluyla gerçekleşir. Osteosit prosesleri ve geniş laküner kanaliküler ağdaki neredeyse tüm diğer kemik hücreleri arasındaki bu bağlantılar, osteositlerin kemik üzerindeki mekanik yükü ve ayrıca stres veya yorgunluk kaynaklı mikro hasarı tespit eden

mekanosensörler olarak hizmet etmesine ve osteoblastlarda ve osteoklastlarda iyileştirici aktiviteyi tetiklemesine izin verir.

Normalde kemikte en bol bulunan hücreler olan osteositler, osteoblastlardan önemli ölçüde daha az granüllü endoplazmik retikulum, daha küçük Golgi kompleksleri ve daha yoğun nükleer kromatin sergiler. Osteositler kalsifiye matrisi korur ve ölümlerini hızlı matris rezorpsiyonuyla takip eder. Matris ile ilgili aktivitelerin çoğunu osteoblastlarla paylaşırken, osteositler aynı zamanda kemiğin yeniden şekillenmesini düzenlemeye yardımcı olan parakrin ve endokrin etkileri olan faktörler de dahil olmak üzere birçok farklı proteini salgılar (16).

Osteosit dendritik proseslerinden ve diğer kemik hücrelerinin kapsamlı ağına, kemiklerdeki mekanik yükleri izleyen ve hücrelere iyon seviyelerini ayarlamak ve bitişik kemik matrisini buna göre korumak için sinyal gönderen bir "mekanostat" adı verildi. Direnç egzersizi, etkilenen bölgelerde kemik yoğunluğunu ve kalınlığını artırabilirken, egzersiz eksikliği (veya astronotların yaşadığı ağırlıksızlık), kısmen kemik hücrelerinin mekanik uyarımının olmaması nedeniyle kemik yoğunluğunun azalmasına yol açar (13).

2.2.4 Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik büyümesi ve yeniden şekillenmesi sırasında matris rezorpsiyonu için gerekli olan çok sayıda çekirdeğe sahip çok büyük, hareketli hücrelerdir. Osteoklastların büyük boyutu ve çok çekirdekli durumu, kökenlerinin kemik iliği kaynaklı monositlerin füzyonundan kaynaklanmaktadır. Osteoklast gelişimi, osteoblastlar tarafından üretilen iki polipeptit gerektirir: makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF); ve nükleer faktör-kB ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü. Rezorpsiyona maruz kalan kemik alanlarında, kemik yüzeyindeki osteoklastlar, matrikste rezorpsiyon boşlukları (veya Howship boşlukları) olarak bilinen boşluklar içinde bulunur (13).

Aktif bir osteoklastta, kemiğe temas eden zar alanı, hücreyi kemik matriksine sıkıca bağlayan dairesel bir sızdırmazlık bölgesi oluşturur. Osteoklastların kıvrımlı sınırları (ruffled border) sızdırmazlığın sağlanmasını sağlar. Bu çevresel sızdırmazlık

bölgesi, osteoklast ile kemik rezorpsiyonunun meydana geldiği matris arasında özel bir mikro çevrenin oluşmasına izin verir.

Bu hücre altı cebine, osteoklast, bitişik hidroksiapatitin çözünmesini hızlandırmak için protonları pompalar ve matris proteinlerinin lokalize sindirimi için lizozomla ilişkili salgı veziküllerinden matris metaloproteinazları ve diğer hidrolitik enzimleri serbest bırakır (16).

Yoğun, ağır kemikler (—mermer kemikler) ile karakterize edilen genetik hastalık osteopetrozunda, osteoklastların kıvrımlı sınırları(ruffled border) yoktur ve kemik rezorpsiyonu sorunludur. Bu bozukluk, genellikle kemik iliği boşluklarının obliterasyonu, kan hücresi oluşumunun baskılanması ve anemiye ve beyaz kan hücrelerinin kaybına neden olarak kemiklerin aşırı büyümesi ve kalınlaşması ile sonuçlanır. Osteopetrozlu hastaların çoğunda kusurlu osteoklastlar, hücrelerin proton ATPase pompaları veya klorür kanalları için genlerde mutasyonlara sahiptir (13).

2.3 Kemik Matriksi

Kemik matriksi %60-70'ini inorganik matrikstir, %30-40'ını organik yapı,su ise %10-29'unu oluşturur (16).

2.3.1 İnorganik Matriks

Kemik matrisinin kuru ağırlığının yaklaşık %50'si inorganik maddelerdir. Kalsiyum hidroksiapatit en çok bulunur, ancak bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum iyonları da bulunur. Önemli miktarlarda kristal olmayan kalsiyum fosfat da mevcuttur. Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyi hidratedır ve mineral ve vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır (14, 13).

Kemiği daha sert yapan kollajenin hidroksiapatit kristallerinin birleşmesidir. Kemik dekalsifikasyonu olduğunda şekil korunur ancak yumuşak haldedir. Organik birleşenler kemikten uzaklaşır ise, kemiğin formu bozulmaz ancak kırılma ihtimali artar (16).

2.3.2 Organik Matriks

Kalsifiye matrikse gömülü organik madde %90 tip I kollajendir, fakat aynı zamanda çoğunlukla küçük proteoglikanlar ve osteonektin gibi multiadeziv glikoproteinler içerir. Kalsiyum bağlayıcı proteinler, özellikle osteokalsin ve matris veziküllerindeki hücrelerden salınan fosfatlar, matrisin kalsifikasyonunu destekler. Tip I kollajenden zengin diğer dokularda osteokalsin ve matris vezikülleri yoktur ve bu nedenle normalde kalsifiye olmazlar.

Kalsifikasyon sırasında minerallerin kolajen lifleri ile birleşmesi, kemik fonksiyonu için gerekli olan sertliği ve direnci sağlar. Bir kemik bir histolog tarafından dekalsifiye edilirse şekli korunur ancak diğer bağ dokuları gibi yumuşak ve esnek hale gelir. Yüksek kolajen içeriği nedeniyle, dekalsifiye kemik matrisi genellikle asidofiliktir (5, 13, 16).

2.4 Periosteum ve Endosteum

122

123 Kemiklerin dışı periosteum içi ise endosteumun ile kaplıdır. İkisi bağ dokusudur.

124

2.4.1 Periosteum

Periosteum, kıkırdak perikondriumuna çok benzer şekilde organize edilmiştir; dış fibröz yoğun bağ dokusu tabakası, çoğunlukla demetlenmiş (Sharpey lifleriyle) tip I kollajen, aynı zamanda fibroblastlar ve kan damarları içerir. Perfore eden (veya Sharpey) lifler olarak adlandırılan periost kollajen demetleri, kemik matrisine nüfuz eder ve periostu kemiğe bağlar. Periosteal kan damarları dallanır ve kemiğe nüfuz eder, metabolitleri kemik hücrelerine ve kemik hücrelerinden taşır.

Periosteumun iç tabakası daha hüreseldir ve osteoblastlar, kemik örtücü hücreleri ve osteoprogenitör hücreler olarak adlandırılan mezenkimal kök hücreleri içerir. Kapsamlı bir şekilde çoğalma ve birçok yeni osteoblast üretme potansiyeli ile osteoprogenitör hücreler kemik büyümesinde ve onarımında önemli bir rol oynar (14, 13).

2.4.2 Endosteum

İnternal kısmında çok ince endosteum bulunur. Kemik iliği boşluklarına çıkıntı yapan küçük kemik matriks trabeküllerini kapsar. Endosteum ayrıca osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve kemik örtücü hücreleri içerir, ancak seyrek, hassas bir kolajen lif matrisi içindedir. Hematopoetik ve osteojenik özelliğin yanısıra, osteojenik etkinlik büyüme ve gelişim tamamlandığında devamlılığını sürdürüyor.

Periosteum ve Edosteum bağ dokusu tabakaların ana fonksiyonu kemiğin beslenmesi, yapımı ve onarımıdır (13).

2.5 Osteogenezis (Kemik Gelişimi)

Kemik dokusunun temel gelişimi iki şekilde görülmektedir. Osteoblastların doğrudan mezenşimden farklılaştığı ve osteoid salgılamaya başladığı intramembranöz kemikleşme ve önceden var olan bir hiyalin-kıkırdak matrisinin aşındığı, osteoblastlar tarafından istila edildiği ve daha sonra osteoid üretimine başladığı endokondral kemikleşme (16).

2.5.1 İntramembranöz Kemikleşme

Çoğu yassı kemiğin oluşmaya başladığı intramembranöz ossifikasyon, embriyonik mezenkimal dokunun yoğun tabakaları (–membranlar) içinde gerçekleşir. Kafatası ve çene kemiklerinin yanı sıra skapula ve klavikula kemiklerinin çoğu, intramembranöz kemikleşme ile embriyonik olarak oluşturulur. Yoğunlaşmış mezenkim içinde kemik oluşumu, osteoprogenitör hücrelerin ortaya çıktığı, çoğaldığı ve gelişmekte olan bir kılcal damar ağı etrafında eksik osteoblast katmanları oluşturduğu ossifikasyon merkezlerinde başlar. Osteoblastlar tarafından salgılanan

osteoid, daha önce tarif edildiği gibi kalsifiye olur, lakuna ve kanaliküllerde osteositlerle birlikte küçük düzensiz örgülü kemik alanları oluşturur.

Devam eden matriks salgılanması ve kalsifikasyon bu alanları büyütür ve komşu kemikleşme merkezlerinin kaynaşmasına yol açar. Örgülü kemik matrisi, ilik ve daha büyük kan damarları ile kanselöz (süngerimsi) kemiğin bir bölgesini çevreleyen kompakt kemik ile yer değiştirdikçe, anatomik kemik yavaş yavaş oluşur. Kemikleşmeye uğramayan mezenkimal bölgeler, yeni kemiğin endosteumunu ve periostumu oluşturur (18, 19).

Kranial yassı kemiklerde, hem iç hem de dış yüzeylerde lameller kemik oluşumu kemik rezorbsiyonuna baskındır (5, 18, 19, 20). İç ve dış kompakt kemik tabakalar ortaya çıkarken, merkezi kısım (diploe) süngerimsi yapısını korur.

Yeni doğan bebeklerin başlarındaki fontaneler veya -yumuşak noktalarl, membranöz dokunun henüz kemikleşmediği kafatası bölgeleridir (14).

2.5.2 Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme, oluşturulacak kemiğin küçük bir versiyonu veya modeli olarak şekillenen hiyalin kırkırdak içerisinde gerçekleşir. Bu tür kemikleşme vücudun çoğu kemiğini oluşturur ve uzun kemiklerin geliştirilmesi birkaç olaylar dizisinden oluşur.

Çoğu kemiğin başlangıçta olduğu bu süreç, hiyalin kırkırdaktan yapılmış iskelet elemanlarının embriyonik modelleri ile başlar. İlk trimesterin sonlarında, kırkırdak modelinin ortasındaki perikondriyumun altında bir kemik yakası gelişir ve alttaki kırkırdakta kondrosit hipertrofinine neden olur.

Bunu, diyafizde birincil bir kemikleşme merkezi oluşturmak için periosteumdan gelen kılcal damarlar ve osteoprogenitör hücreler tarafından bu kırkırdığın istilası takip eder.

Burada osteoid, yeni osteoblastlar tarafından depolanır, kalsifikasyona uğrayarak örgü kemiğe dönüşür ve daha sonra kompakt kemik olarak yeniden şekillenir.

Doğum sırasında, kemiğin epifizlerinde benzer bir süreçle ikincil kemikleşme merkezleri gelişmeye başlar. Çocukluk döneminde, birincil ve ikincil kemikleşme merkezleri, yalnızca sürekli kemik uzamasını sağlayan epifiz tabakası tarafından kademeli olarak ayrılır. İki kemikleşme merkezi, tam boy elde edildiğinde epifiz tabakası kaybolana kadar birleşmez. Yaka, oksijen ve besinlerin alttaki kırdağa difüzyonunu engeller, lokal kondrositlerin şişmesine (hipertrofi), çevreleyen matrisi sıkıştırmasına ve osteokalsin ve alkalın fosfataz salarak kireçlenmesini başlatmasına neden olur. Hipertrofik kondrositler sonunda ölü ve kalsifiye matris içinde boş alanlar yaratır. Perikondriumdan (şimdi periosteum) bir veya daha fazla kan damarı kemik yakasına nüfuz ederek osteoprogenitör hücreleri gözenekli merkezi bölgeye getirir. Vasküler yapı ile birlikte yeni oluşan osteoblastlar, mevcut tüm alanlara hareket eder ve dokuma örgü üretir.

Bu aşamada kalsifiye kırdağ kalıntıları, yeni oluşan osteoblastların damar yapısıdır ve mevcut tüm boşluklara hareket eder ve örgü kemik üretir. Bu aşamadaki kalsifiye kırdağ kalıntıları bazofiliktir ve yeni kemik daha asidofiliktir (5, 13, 16).

2.6 Kemik İyileşmesi

Kemik büyümesi, hem daha önce oluşan kemik dokusunun sürekli rezorpsiyonunu hem de kemiğin azalımını aşan bir oranda yeni kemiğin aynı anda oluşmasını içerir. Büyüyen bir kemikteki osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin toplamı, her kemiğin kütlesini artırırken genel şeklini koruyan osteogenezi veya kemik modelleme sürecini oluşturur. Küçük çocuklarda kemik turnover hızı çok aktiftir ve yetişkinlerden 200 kat daha hızlı olabilir. Yetişkinlerde iskelet, kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumu için koordineli, lokalize hücrel aktiviteleri içeren bir kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde sürekli olarak yenilenir (21).

Kemiğin sürekli yeniden şekillenmesi, sertliğine rağmen bu dokunun plastik kalmasını ve değişen stresler karşısında iç yapısını adapte edebilmesini sağlar.

Kemik plastisitesinin iyi bilinen bir örneği, çene kemiğindeki dişlerin pozisyonlarının ortodontik apareyler tarafından üretilen lateral basınçlarla değiştirilebilmesidir. Traksiyon kuvvetin uygulandığı tarafta kemik oluşur ve basıncın

uygulandığı karşı tarafta rezorbe olur. Bu şekilde, kemik yeniden şekillendirilirken dişler çene içinde hareket eder.

Periosteum, endosteum ve kemik iliğinde osteoprogenitör kök hücreler içerdiğinden ve çok iyi vaskülarize olduğundan, kemik normal olarak mükemmel bir onarım kapasitesine sahiptir. Bir kırık veya başka bir hasardan sonra kemik onarımı, hücreleri, sinyal moleküllerini ve kemiğin yeniden şekillenmesinde zaten aktif olan süreçleri kullanır.

Kemikte cerrahi olarak oluşturulan boşluklar, özellikle periost yerinde bırakıldığında yeni kemikle doldurulabilir. Tipik olarak kemik kırığı onarımı sırasında meydana gelen ana aşamalar, ilk fibrokartilaj oluşumunu ve bunun geçici bir dokuma kemik kallusu ile değiştirilmesini içerir.

Kemik kırıkları, fibrokartilaj oluşumunu ve ana kemik hücrelerinin osteojenik aktivitesini içeren gelişimsel bir süreçle onarılır. Kemik kırıkları kan damarlarını bozarak kırığa yakın kemik hücrelerinin ölmesine neden olur. Hasarlı kan damarları lokalize bir kanama veya hematoma üretir.

Pıhtılaşmış kan makrofajlar tarafından doku artıkları ile birlikte uzaklaştırılır ve hasarlı, hücresiz kemik matrisi osteoklastlar tarafından emilir.

Kırık bölgesindeki periosteum ve endosteum, yoğun proliferasyonla yanıt verir ve kırığı çevreleyen ve kırık kemiğin ekstremitelerini kaplayan yumuşak bir fibrokartilaj benzeri doku kallusu üretir.

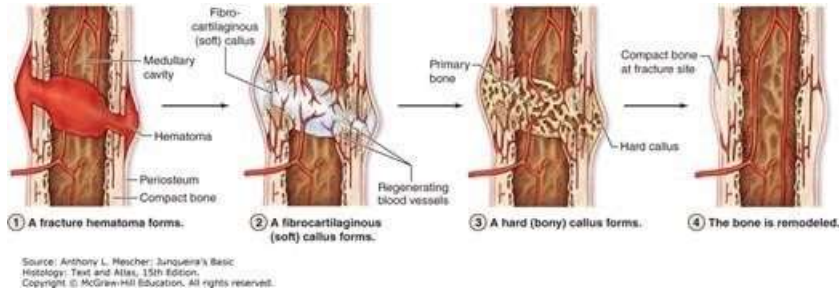
Fibrokartilajinöz kallus, endokondral ve intramembranöz ossifikasyonun bir kombinasyonunu andıran bir süreçte kademeli olarak değiştirilir. Bu, kemiğin kırık uçlarının etrafında sert bir örgü kemik kallusu üretir.

Onarım sırasında ve hastanın kademeli olarak aktiviteye dönüşü sırasında kemiğe uygulanan stresler, kemik kallusunun yeniden şekillenmesine hizmet eder. Kallusun olgunlaşmaması, örülmüş kemiği, kademeli olarak emilir ve lamellar kemik ile değiştirilir, yeniden şekillenir ve orijinal kemik yapısını eski haline getirir (14, 22).

Kemik iyileşmesi 3 aşamada gerçekleşir:

- İnflamatuar Faz
- Reperatif Faz (Tamir Fazı)

- Remodelling Fazı (23).



Şekil 2 Kemik iyileşme aşamalarının gösterimi (15)

2.6.1 İnflamatuar Faz

Kemik kırılmasının hemen ardından inflamatuvar bir yanıt oluşur. Travma, kırık bölgesinin içinde ve çevresinde kan damarı yırtılmasına neden olarak hematomla sonuçlanır. Hematom başlangıçta lokal hipoksi, asidite ve düşük sıcaklık ile karakterize edilir. Kalsiyum ve laktik asit açısından zengindir. Hematom, inflamatuvar hücrelerin ve çeşitli sitokinlerin (IL1, IL6, TNF α , CCL2) inflamatuvar fazı başlatmak için bir iskele görevi görür (24).

İlk olarak, PMN'ler toplanır ve ardından monositler/makrofajlar kırık bölgesine sızarak (25). Makrofajlar M1 fenotipine polarize edilir. Makrofajların infiltrasyonundan sonra, immün yanıt, lenfositlerin kırık bölgesine invazyonu ile yansıtılan adaptif immüniteye doğru kayar.

PMN'ler ve makrofajlar, ölü hücre ve kalıntı alanını temizler. Süreç, karmaşık ve iyi düzenlenmiş bir aktivite olan iltihabın çözülmesine dönüşür. Bu süreçte inflamatuvar yanıtı başlatan ajanlar, proinflamatuvar mediatörlerin sentezi azalır ve immün hücreler yavaş yavaş dokudan temizlenir (16).

Kemik dokularında bulunan makrofajların özel bir alt tipi olan osteomaklar, hem endosteum hem de periosteum içindeki kemik örtücü hücreleri arasında dağılır ve kemik homeostazına katkıda bulunur. Osteomaklar sadece orijinal zedeleyici uyarıyı algulamakla ve inflamatuvar fazını başlatmakla kalmaz, aynı zamanda kemik iyileşmesi için gerekli hücreyel olayları başlatan bir molekül kaynağı sağlar (26, 27)

Akut inflamasyonun çözülmesi sırasında, makrofajlar, IL4, IL10 ve IL13 gibi anti-inflamatuvar sitokinler tarafından M1 fenotipinden M2 fenotipine polarize edilir. BM-MSK'ler lokal olarak TNFa(24) ve stromal hücre kaynaklı faktör 1 (SDF1) (askemokin C-X-C motif kemokin ligandı 12 [CXCL12]) gibi sitokinler tarafından çekilir. Toplanan inflamatuvar hücreler ve BM-MSK'ler, osteogenez ve anjiyogenezi başlatmak için pro-inflamatuvar sitokinler, anti-inflamatuvar sitokinler, transforme edici büyüme faktörü β (TGF β), kemik morfojenetik proteinleri (BMP'ler) ve büyüme faktörleri (örn., vasküler endotelial büyüme faktörü [VEGF], trombosit kaynaklı büyüme faktörü [PDGF] , fibroblast büyüme faktörü -2 [FGF-2]) aracılığıyla hücreler arası iletişime katılır (17)

Bu süreç aynı zamanda bir sonraki kallus oluşumu için bir Şablon oluşturan onarıcı bir granülom da oluşturabilir (28, 29)

Akut inflamatuvar yanıt 24-48 saat içinde zirve yapar ve kırktan yaklaşık 1 hafta sonra kaybolur.

2.6.2 Reperatif Faz

Onarım aşamasında, damar tomurcukları bölgeye doğru büyüdükçe kallus oluşur ve kolajen matrisi serilir. Kallus oluşumunun iki tür süreci vardır: intramembranöz ossifikasyon ve endokondral ossifikasyon. (15, 30)

Intramembranöz kemikleşme: periosta meydana gelir ve doğrudan sert kallus oluşturur. Periosteal MSC'ler osteoprogenitör hücrelere farklılaşır, bunlar daha sonra çoğalır örgü kemiği oluşturan osteoblastlara farklılaşır.

Endokondral ossifikasyon: endosteum ve kemik iliğinde meydana gelir. Yumuşak kallus ve ardından sert kallus oluşturur. BM-MSK'ler kondrositlere farklılaşır ve kırkdaklı bir iskelet oluşturan bir kırkdak matrisi salgılar. Kondrositler daha sonra

hipertrofik farklılaşmaya uğrar ve kırıkta kallus oluşturmak için çevreleyen matrisi mineralize eder.

Son olarak, hipertrofik kondrositler apoptoza uğrayarak vasküler invazyon ve osteoblastların göçü ile sonuçlanır. Kırıkta matris daha sonra kemik matrisine dönüşür. (15, 30) IL1 ve IL6 dahil olmak üzere proinflatuar sitokinler bu fazda yoktur (31). TNFa da erken onarım fazında azalır, ancak geç onarım fazında artar (23).

Endokondral ossifikasyon sürecinde TNFa, kondrosit apoptozunu, mineralize kırıkta rezorpsiyonunu ve vaskülarizasyonu kolaylaştırır (18, 23, 19) Düşük TNFa seviyeleri ayrıca osteoblast proliferasyonunu artırır, ancak yüksek seviyeler bu süreçleri inhibe eder. (23). Ek olarak, osteal makrofajlar, aktif küboidal osteoblastların bölgeleri üzerinde, kemik oluşum bölgelerinde zenginleşir. Osteal makrofajlar, onarım ve yeniden şekillenme evrelerinde kemik dokularının olgunlaşması ile ilişkilidir (26, 27).

Sonuç olarak, osteoklastlar kemiği parçalayan oldukça farklılaşmış çok çekirdekli hücrelerdir.

2.6.3 Remodelling Fazı

Kemik iyileşmesinin geç aşamasında, kemik yeniden şekillenme yoluyla orijinal yapısına, şekline ve mekanik özelliklerine geri döndürülür. Lamellar kemik birikimi ve kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanan osteoblastik ve osteoklastik aktivite arasındaki denge, yeniden şekillenme aşamasında önemli bir rol oynar (15, 30, 31).

Birkaç proinflatuar sitokin (örneğin IL1,IL6 ve TNFa) yüksek oranda eksprese edilir (31, 32).

2.7 Kemiğin metabolik rolü

Kalsiyum iyonları, hücre adezyonu, hücre iskeleti hareketleri, ekzositoz, membran geçirgenliği ve diğer hücresel fonksiyonlara aracılık eden birçok enzimin ve birçok proteinin aktivitesi için gereklidir. İskelet vücudun kalsiyum deposu görevi görür. Hidroksiapatit kristallerinde toplam kalsiyumunun %99'unu içerir. Kandaki

kalsiyum (910 mg/dL) ve dokulardaki kalsiyum konsantrasyonu, kan kalsiyumu ile kemik kalsiyumu arasındaki sürekli değişim nedeniyle genellikle oldukça stabildir. Kan kalsiyum düzeylerini yükseltmenin temel mekanizması, iyonların hidroksiapatitten interstisyel sıvıya, esas olarak kanselöz kemikte mobilizasyonudur.

Ca²⁺ mobilizasyonu esas olarak kemik hücreleri arasındaki parakrin etkileşimleri tarafından düzenlenir, bunların çoğu iyi anlaşılmamıştır, ancak iki polipeptit hormonu da kalsiyum homeostazını etkilemek için kemik hücrelerini hedef alır:

Paratiroid bezlerinden gelen paratiroid hormonu (PTH), osteoklastları ve osteositleri kemik matriksini rezorbe etmek ve Ca²⁺ salmak için uyararak düşük kan kalsiyum seviyelerini yükseltir.

PTH osteoklastları dolaylı yolla etkiliyor. PTH reseptörleri osteoblastlarda meydana gelir. Osteoblastlar RANKL ve diğer parakrin faktörleri salgılayarak osteoklast oluşumunu ve aktivitesini uyarır.

Tiroid bezinde üretilen kalsitonin, PTH'nin kemik üzerindeki etkilerine karşı çıkarak yüksek kan kalsiyum seviyelerini azaltabilir. Bu hormon, matris emilimini ve kemik döngüsünü yavaşlatmak için doğrudan osteoklastları hedefler.

Alkalın fosfataz (ALP): Mineralize ve sert doku hücrelerinin oluşumunda kritik bir rol üstlenen kemik markeridir. ALP inorganik fosfat seviyesini lokal olarak artırıp mineralizasyonu tetikler, aynı zamanda ekstraselüler fosfataz konsantrasyonunu düşürüp mineral oluşumunu inhibe etmektedir.

Osteokalsin: Düşük molekül ağırlıklı kemikte en yaygın olarak bulunan non kolajen proteindir. Osteokalsin remodeling esnasında osteoblastlar tarafından üretilmektedir ve oluşumu D vitamini ile doğrudan ilişkilidir (15).

2.8 Kritik Boyutlu Kemik Defektleri

Kritik boyutlu kemik defektleri, hayvanların kemiklerinde herhangi bir kemik iyileştirici madde kullanılmadan yaşam boyunca kendiliğinden iyileşmeyen ve oluşmayan en küçük kemik yaraları (intraosseöz yaralar) olarak tanımlanır. Bu tip

defekt kemikten ziyade fibrotik doku ile dolma ve iyileşme eğilimindedir (33, 34, 35, 36, 37).

Kalvaria, canlı organizmaların temel bir yapısıdır (38). Kemik grefti materyalinin en yaygın olarak test edildiği kafatası, supraorbital kenardan dış oksipital çıkıntıya kadar uzanır. Parietal, oksipital ve temporal kemik skuamöz kısımlarını, frontal kemik ve sfenoid kanadının büyük bir kısmını içerir: (39, 40, 41)

Morfolojik ve embriyolojik olarak kalvaria membranöz kemikleşme ile oluşur (40, 41, 42). Bu nedenle maksillofasial bölgede membranöz yollarla oluşturulan diğer kemiklere benzerlik gösterir (39). Kalvarianin kortikal kemiği fizyolojik olarak atrofik mandibulaya yakındır.

Anatomik olarak kalvaria, mandibula gibi iki kortikal tabaka arasında yer alan kanselöz bir kemikten oluşur (1, 4, 10, 19, 43, 44). Bu yüzden kalvaria bölgesi deneysel amaçlar için en önemli bölgelerden biridir (22, 45).

2.9 Kemik Greftleri ve Kemik Yerine Geçebilen Biyomateryaller

Orijine göre kemik greftleri ve biyomateryaller 4 gruba ayrılmaktadır:

- Otojen Greftler
- Allogreftler (Homogreftler)
- Ksenogreftler (Heterogreftler)
- Alloplastik greftler (Sentetik greftler).

Kemik grefti, tek başına veya diğer materyallerle kombinasyon halinde kemik defektine nakledilen, kemik iyileşmesini teşvik edebilen canlı bir doku olarak tanımlanır. (46, 47). Kemik grefti, aynı amacı gerçekleştirebilen, genellikle canlı hücre içermeyen, yalnızca mineralize bir kemik matrisi içeren doğal veya sentetik bir malzemedir (48). Kemik greftleri tıp alanında yüzyıllardır kullanılmaktadır. Greftlerinin ilk kez (49): 7'de kullanımı kayıtlara geçmiştir. Kranial defekt ölen bir köpekten alınan bir kranial kemik grefti kullanılarak başarılı bir şekilde restore edilmiştir (50). Diş implantolojisindeki ilerlemeler ve kraniofasial kemik

defektlerinin onarımı için artan ihtiyaç nedeniyle diş hekimliğinde kemik greftlerinin kullanımı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır.

Bu kemik veya iskelet defektleri travma, periodontal hastalık, cerrahi eksizyon, kranyoplasti, enfeksiyon veya konjenital malformasyonlar ve ağız kanserinden kaynaklanabilir (47). Dişhekimliğinde yetersiz kemik miktarının en yaygın gözlemi, diş kaybını takip eder; alveolar kemiğin hızlı rezorpsiyonu, tipik olarak periodontal ligament lifleri yoluyla meydana gelen intraosseöz stimülasyonun yokluğu nedeniyle meydana gelir (49) Dental implantların başarılı bir şekilde yerleştirilmesi, yeterli alveolar kemik boyutları, yani en az 10 mm yükseklik ve 3 mm ila 4 mm çap gerektirir (51).

Dünya çapında kemik grefti bu yaygın kullanımına rağmen, halen kullanılan malzemelerle ilişkili sınırlamalar vardır. İu anda piyasadaki ürünlerin hiçbiri, düşük hasta morbiditesi, kullanım kolaylığı, düşük immünojenisite, düşük maliyet ve anjiyojenik potansiyel dahil olmak üzere bir kemik grefti materyali için ideal özelliklerin tümüne sahip değildir (29, 35, 52)

Otogreftlerin dezavantajları arasında greft dokusunun yeterince olmaması, ağrı, donör sahada morbidite ve iki ameliyat prosedürüne ihtiyaç vardır; Allogreftlerin dezavantajları, alıcının bağışıklık sistemi tarafından donör dokusunun reddedilmesini ve HIV, hepatit gibi hastalıklar bulaşma riski içerir. (10)

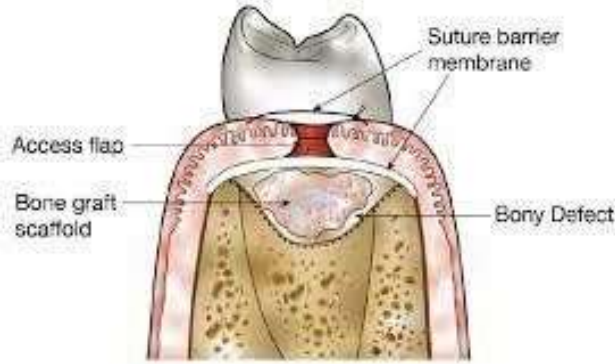
Kemik greftlerinin ana işlevi, mekanik destek sağlamak ve osteorejenerasyonu stimüle etmektir (Osseointegrasyon, osteogenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyonun dört temel biyolojik özelliği, bu rolü etkin bir şekilde yerine getirmede çok önemlidir (19, 41). Bir greft materyalin araya giren fibröz doku tabakasının yokluğunda kemiğin yüzeyine kimyasal olarak bağlanma yeteneği, osseointegrasyon olarak adlandırılır.

Osteogenez, greft materyali içinde mevcut olan osteoblastlar veya progenitör hücreler yoluyla yeni kemik oluşumunu ifade eder ve osteokondüksiyon, bir kemik grefti materyalinin, üzerinde konakçı hücrelerin büyüebileceği biyoaktif bir yapı iskelesi oluşturma yeteneğini ifade eder (42, 46). Bu yapı, damarların, osteoblastların ve konakçı progenitör hücrelerin birbirine bağlı osteomatrikse göç etmesini sağlar.

Osteoindüksiyon, lokal proteinlerin ve diğer faktörlerin kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını indüklediği greft bölgesine konakçı kök hücrelerin yer alınmasıdır (10).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF'ler), fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) ve transforme edici büyüme faktörleri- β (TGFs- β) dahil olmak üzere birçok büyüme faktörleri bu süreci etkiler. Bu dört temel özellik, doğrudan kemik ara bağlantısına paralel olarak ortaya çıkan yeni kemik oluşumunu mümkün kılar (19, 29). Ek olarak, çeşitli diğer özellikler bir kemik greftinin başarı oranını etkileyecektir. Bunlar, biyouyumluluk, biyolojik olarak emilebilirlik, sterilite, yapısal bütünlük, damar büyümesi için yeterli gözeneklilik, plastisite, kullanım kolaylığı, maliyet ve basınç dayanımı (19).

Bu faktörlerin kombinasyonu, kullanımlarının temelini oluşturur. Konak dokular tarafından yeterli uzun vadeli tolerans ve başarılı osteorejeneratif süreçlerin meydana gelme şansının artırıyor (19). Çalışmalar, hemen hemen tüm mevcut kemik greftleri, osteo-rejeneratif süreçlerin meydana gelmesi için yapısal bir çerçeve olarak hizmet ettiğini, bu nedenle sadece daha önce tartışılan ideal özelliklerin osteokodüktif bileşenini karşıladıklarını bulmuştur (15, 19, 29, 35)



Şekil 3 Kemik greftin ve membranın kemik defektinde yerleşmesi

Kemik kusurlarını onarmak için yapısal iskelelerin kullanılması. Diyagram, bir flebinin cerrahi olarak oluşturulmasını takiben alveolar kemikte bir kemik defektine kemik grefti iskelesinin yerleştirilmesini göstermektedir.

2.9.1 Otojen Greftler

Otojen greftler, iyi kortikal ve süngerimsi kemik kaynakları olmaları nedeniyle, genellikle mandibular simfizis, mandibular ramus, eksternal oblik kret, iliak kret, proksimal ulna veya distal radius gibi aynı kişiden alınan intraoral ve ekstraoral bölgelerden elde edilir (47). Mandibular ramustan alınan otogreft kemiği, daha küçük komplikasyonlarıyla ilişkilidir diğer intraoral alanlara karşılaştırıldığında. Yine de inferior alveolar sinire zarar verme riski taşır. Mandibular ramus greftleri, augmentasyon gerektiren bölgelerin kalınlığı 4 mm'den az olduğunda kullanıma uygundur ve maksimum dört dişi kapsar (35, 53)

Otogreftlerle ilişkili doku uyumluluğu ve immünojenisite sorunları yoktur, bu nedenle en yüksek biyolojik güvenlik derecesini temsil ederler. Bununla birlikte, otogreftlerle ilişkili, ikincil bir cerrahi gerekliliği, donör saha yaralanması ve skar potansiyeli gibi birkaç olumsuz taraf vardır. Ek olarak, otogreftler daha yüksek cerrahi maliyetler, daha önemli cerrahi riskler, örneğin aşırı kanama, enfeksiyon, iltihaplanma ve ağrı ile ilişkilendirilmiştir ve bu da uygulamalarını nispeten daha küçük kemik defektleriyle sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, büyük kraniyofasiyal defektlerde otogreftler geçerli bir seçenek olmayabilir (34, 35, 37, 42)

Kansellöz kemik en yaygın olarak otogreftler için kullanılır ve önemli ölçüde osteojenik potansiyele sahip osteoblastlar ve progenitör hücreler içerir. Göreceli olarak geniş trabeküler yüzeylere sahiptirler, bu da osteoindüktif bir ortamın oluşmasını kolaylaştırır ve revaskülarizasyonun alıcı bölgeye dahil edilmesinin teşvik eder. Buna karşılık, kortikal kemikte osteoblastlar ve osteojenik hücreler yoktur; bunun yerine

yapısal-mekanik bütünlük sağlar ve osteokondüksiyon yoluyla kemik iyileşmesini destekler. Kortikal greftler, sınırlı revaskülarizasyon potansiyelleri nedeniyle süngerimsi greftlere göre daha yavaş entegre olur.

Bu nedenle, kemiğin yeniden şekillenme performansını ve iyileşme potansiyelini en üst düzeye çıkarmak için süngerimsi ve kortikal kemiğin bir kombinasyonu kullanılır (52). Son yıllarda çok sayıda kemik greftlerin geliştirilmesine rağmen, otojen greftler, gerekli dört temel biyolojik özelliğin tümüne sahip olan tek greft materyali olduklarından, altın standart olmaya devam etmektedir (53).

2.9.2 Allogreftler (Homogreftler)

Otojen greftin birincil alternatifi, uyumlu bir canlı donörden veya kadavra kemik kaynaklarından elde edilebilen allogreft materyallerinin kullanılmasıdır (52). Allogreft materyalleri, taze, dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş olmak üzere üç ana formda hazırlanabilir. Taze ve donmuş allogreft materyalleri üstün osteoindüktif özelliklere sahiptir, ancak konakçı immünojenik yanıt riskinin yüksek olması, sınırlı raf ömrü ve hastalık bulaşma riski nedeniyle günümüzde nadiren kullanılmaktadır. Allogreft materyalinin dondurularak kurutma yoluyla, osteoindüktif potansiyelin azalması, yapısal gücün ve osseointegrasyonun azalması pahasına olsa da materyalin raf ömrünü artırıyor ve immünojenitesi azalıyor (52). Son yıllarda allogreft materyallerinin kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir (54).

Bu, büyük ölçüde, otojen greftleme ile ilgili önemli endişelerin çoğunun hafifletilmesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve Hepatit B ve C gibi bulaşıcı hastalık bulaşma riski ile ilgili sınırlamalar devam etmektedir. Çalışmalar, kalça artroplastisi sırasında çıkarılan osteoartritik femur başlarında bilinmeyen hastalıkların ~%8 prevalansı olduğunu bulmuştur (51). Bu endişeler genellikle sterilizasyon, mekanik debridman, ultrasonik yıkama ve gama ışınlaması gibi doku işleme yoluyla hafifletilebilir (29). Allogreftler, kemik büyütme prosedürlerinde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (GBR) için ksenograftlarla

kombinasyon halinde başarıyla kullanılmıştır. Allogreftler iyi histo-uyumluluk sergilerler ve tüm kemik segmentlerinden çeşitli formlarda bulunurlar. Allogreft malzemeleri, alıcı bölgelerin gereksinimlerini karşılamak için özel şekillerde de üretilir. Bununla birlikte, süngerimsi otogreftler ve allogreftler, zayıf mekanik mukavemete sahiptir ve alkol, asetik asit veya nitrik asit ile tedaviyi içeren doku işleme teknikleri malzemelerin osteoindüktif yeteneklerini azalttığından, kanselloz allogreftler de yetersiz iyileşme kapasitesi sergiler (52).

Kanselloz allogreftler, lokal konakçı inflamatuvar yanıtı neden olabilir ve bu da fibröz doku oluşumuna neden olabilir böylece yeni kemik oluşumuna müdahale eder. Kortikal allogreftler, kortikal otojen greftlere benzerdir ve önemli bir mekanik güce sahiptir ve büyük ölçüde, bir ilk inflamatuvar kaskadı takiben meydana gelen kemik iyileşme süreçleri için mekanik bir iskele sağlamaya hizmet eder (52, 55).

2.9.3 Ksenogreftler (Heterogreftler)

Daha önce tartışıldığı gibi, otogreftler ve allogreftler, kemik grefti uygulamasındaki mükemmel başarı oranlarına rağmen doğal sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle, doğal kemik greftleri uygun bir kemik büyümesi mikro ortamı yaratarak gelişmiş osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif potansiyelleri teşvik etmek için geliştirilmiştir (56). Ksenograftlar konakçıdan genetik olarak alakasız bir türden türetilen greftleme materyalleridir (29). Dental alandaki en yaygın ksenograft materyali kaynağı deproteinize sığırdır.

Ticari olarak BioOss™ olarak temin edilebilir. Sığır kemiği, kademeli bir tavlama işlemi ve ardından NaOH ile kimyasal işleminden geçirilir. Yalnızca inorganik bileşenlerini içeren gözenekli hidroksiapatit (HA) malzemesi elde edilir. Ortaya çıkan gözenekli yapı, insan kemiğine oldukça benzer, iyi mekanik destek sağlayabilir ve osteokondüksiyon yoluyla kemik iyileşmesini uyarabilir. Gözenekli yapı, geniş bir yüzey alanı sergiler ve anjiyogenez yoluyla yeni kan damarlarının büyümesini destekler böylece kemik büyümesini artırır. Sığır kemiği greftleri, üstün stabiliteyi nedeniyle maksiller sinüs kaldırma ve implant prosedürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. (29, 37)

Çalışmalar, BioOssTM ile greftlenen maksiller sinüs defekti bölgelerinin 6 ay sonra %39 yeni kemik oluşumu ile sonuçlandığını bulmuştur. Bu sonuç aynı zaman periyodundan sonra otojen greft kemiği ile greftlenmenin ardından %40 yeni kemik oluşumu ile karşılaştırılabilir. Ayrıca, otojen greft kemiğinin sadece %18'i ile karşılaştırıldığında, BioOssTM'nin %31'inin greft bölgesinde kaldığını bulmuşlardır (29, 58). Bu istatistikler,

BioOssTM'nin yeni kemik oluşumunu stimüle etmedeki etkinliğinin, otogreft kemiğini geçmesi bile yakından eşleştğini göstermektedir. Özkan ve ark. (59) ayrıca, tek aşamalı maksiller sinüs augmentasyon prosedürlerini takiben sığır kemik greftlerinden elde edilen implantların öngörülebilir aynı anda yerleştirilmesine izin veren yeterli kalite ve hacimde kemik olduğunu bulmuştur (59).

Klinik olarak, BioOss'un iyi kalitede yeni kemik sağlayan ve diş cerrahisini takiben umut verici uzun vadeli sağkalım oranları sağlayan değerli bir kemik greft materyali olduğu kanıtlanmıştır (60).

2.9.4 Alloplastik Greftler (Sentetik Greftler)

Donör bölgelerinde potansiyel immünojenisite ve morbiditenin üstesinden gelmek için, biyolojik özelliklerini doğal kemiği yakından taklit etmek için yapay sentetik kemik greft malzemeleri üretilir. Buna rağmen, Şu anda mevcut olan sentetik malzemeler sadece osteointegratif ve osteokondüktif özellikler göstermektedir (19). Bu kategoriye giren malzemeler Şunları içerir: hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) ve biyocam gibi kalsiyum fosfat seramikleri; nikel-titanyum gibi metaller; polimetilmetakrilat gibi polimerler (PMMA) ve poliglaktitler ve kalsiyum fosfat çimentoları (15, 37).

Hidroksiapatit: HA'nın kimyasal bileşimi, kemiğin inorganik bileşenine çok benzer, bu da onun bir kemik greft materyali olarak kullanılmasını sağlar (49). Ancak sentetik HA, sığır kemiği gibi doğal olarak elde edilen HA'da bulunan ve çeşitli biyomekanik reaksiyonları etkileyen eser miktarda Na⁺, Mg²⁺, K⁺ ve Sr⁺ içermez. Sentetik HA, sığırlarda görüldüğü gibi mikro gözenekli bir yapıya sahip değildir. (10). Sentetik HA, nispeten yüksek Ca/P oranı ve kristalliği nedeniyle gecikmiş bir emilim

hızına sahiptir. HA ile ilgili bir diğer önemli endişe, nispeten düşük mekanik gücü var böylece yüksek yük gerektiren alanlarda kullanılması uygun olmaz. Önceki çalışmalar, sentetik HA ile tek başına veya bir polimer ile kombinasyonu, greftlemenin ardından oluşan yeni kemiğin kalitesinin ve miktarını, endosseöz implantların yerleştirilmesi için alveol yüksekliklerinin korunması, maksiller sinüs kaldırma ve periodontal kemik defektlerinin yönetimi için yetersizdi (44). Bu nedenle, diş hekimliğinde HA uygulaması genellikle implantlar, eksternal fiksatör pimleri veya düşük yüklenme stresi olan bölgelerdeki uygulanması ile sınırlıdır (49, 55).

Trikalsiyum Fosfat Seramikleri (β -TCP): TCP'nin iki kristalografik formu vardır, α -TCP ve β -TCP (Misch 2000). β -TCP, uzun yıllardır kemik yerine kullanılan bir malzeme olarak yaygın olarak kullanılan bir tür kalsiyum fosfat malzemesidir. Düşük Ca/P oranı nedeniyle HA ile karşılaştırıldığında daha hızlı biyolojik bozunma ve absorpsiyon sergiler (55). Saf fazik β -TCP, kullanım kolaylığı, iyileşmenin izlenmesine izin veren radyoopasite, fibrovasküler büyümeyi ve osteojenik hücre yapışmasını destekleyen makroporozite nedeniyle iyi osteoiletkenlik, sığır kemik greftlerine kıyasla iyi emilebilirlik ve düşük immünojenisite ve hastalık bulaşma riski gibi birçok arzu edilen özelliğe sahiptir (29, 43). β -TCP'nin birbirine bağlı gözenekli yapısı gelişmiş vaskülarizasyona izin verirken, aynı zamanda malzemenin sıkıştırma altında zayıf mekanik mukavemeti ile sonuçlanır (29, 34, 35, 37, 55). Bu, β -TCP'nin kemik grefti olarak uygun olmamasına neden olur, ancak kemik defektlerinde dolgu maddesi olarak kullanım ve morfolojik bölgelerde onarım için uygundur (37).

Genellikle marjinal periodontal ve periapikal kusurları onarmak için ve alveolar kemik defektlerinde kısmen emilebilir bir dolgu maddesi olarak kullanılır (61). Nakajima et al. β -TCP'nin kemik rejeneratif potansiyelinin, dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti, deproteinize edilmiş dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti ve otogreft materyallerininkine karşılaştırılabilir olduğunu bulmuştur (62). Bununla birlikte, bu malzemenin mekanik özellikleri, daha geniş uygulamasını sınırlar (48).

Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri (HA ve β -TCP Seramikleri): Biyoaktif camlar (BAG), Ca, Na₂O, H ve P gibi diğer minerallerle birleştirilmiş silikatlardan oluşan bir sentetik silikat bazlı seramik grubudur (48, 55). Biyocamın orijinal bileşimi silikon dioksit (SiO₂), sodyum oksit (Na₂O), kalsiyum oksit (CaO) ve fosfor

pentoksitten (P2O5) oluşuyordu, ancak bu son zamanlarda potasyum oksit (K2O) ilavesiyle daha kararlı bir bileşime dönüştürülmüştür (55). İmplantasyon sırasında vücut sıvılarına maruz kaldığında, silikon iyonları sızabilir ve birikerek materyalin yüzeyinde bir HA tabakası oluşturarak osteojenik progenitör hücrelerin yapışmasına izin verir. Biyocamin arzu edilen özellikleri arasında iyi biyouyumluluk, osteoiletkenlik, antimikrobiyal aktivite ve vaskülarizasyonu destekleyen gözenekli bir yapı bulunmaktadır (48, 55).

Son araştırmalar, çeşitli iyonların BAG ile birleştirilmesinin malzemenin özelliklerini geliştirebildiğini göstermiştir. Esfahanizadeh ve ark. (63) çinko katkılı BAG'nin periodontal hastalıkla ilişkili mikroplar için biyofilm oluşumunun azalmasıyla sonuçlandığını buldu. Ayrıca başka bir araştırma grubu olan Lovelace ve ark. gümüş katkılı BAG'nin malzemeden kontrollü iyon salınımı gösterdiğini ve bunun *Porphyromonas gingivalis* (P.g), *Prevotella intermedia* (P.i) ve *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*'a (A.a) karşı antibakteriyel özelliklerini geliştirdiğini buldu. Bu mikroplar, diş eti hastalığına ve peri-implantite yol açan periodontal dokuların yıkımında merkezi bir rol oynar (63). PerioGlas® ve UniGraft®, 90-710 µm partikül boyutları içeren, piyasada bulunan BAG ürünlerinin örnekleridir.

Bu ürünlerin avantajları, nispeten kolay kullanım ve defekt bölgesine uyurlanabilirliği içerir ve kemik rejenerasyonunu uyarmak için periodontal cerrahide başarıyla kullanılmıştır (64). Daha ileri çalışmalar, kemik altı defektleri için UniGraft® biyoaktif cam ile tedavi edilen on üç hastada cep derinliğinde önemli azalmalar ve ataçmanın yeniden kazanıldığını gözlemledi (55). Bununla birlikte, BAG kırılabilir ve düşük mekanik mukavemetlere ve zayıf kırılma direncine sahip olabilir. Bu nedenle diş hekimliğinde kullanımları düşük stresli ortamlarla veya diğer greft materyalleri ile kombinasyon halinde sınırlıdır (65, 66) .

Bioglass materyalleri, tek taraflı yarık alveolar kemiği büyütme, periodontal kemik dokusunu yönetmek için başarıyla kullanılmıştır. Ortodontik hastalarda diş çekimlerini takiben alveolar kemiği korur (67, 68).

Kalsiyum Fosfat Simanları (CPC'ler): Kalsiyum Fosfat Simanları genellikle bir sulu bileşenden ve yaygın olarak α -TCP ve HA gibi sinterlenmiş CP malzemesi içeren bir toz bileşenden oluşan iki veya üç bileşenli sistemlerdir. Bileşenlerin karıştırılması,

oda sıcaklığında HA nanokristalleri oluşturmak için yerinde sertleşen işlenebilir bir macun ile sonuçlanır (14, 69). CPC'lerin başlıca avantajları, kendi kendine sertleşme kabiliyeti, macunu kusurlu bölgeye şekillendirme kabiliyeti, kemiğin yapısını ve bileşimini tekrarlanabilir bir şekilde kopyalama kabiliyeti, yüksek biyouyumluluğu, farklı tipler için farklı formlarda bulunabilir (48, 55, 69). Bununla birlikte, CPC, hücre yapışması, sıvı değişimi ve geri yüklenebilirlik hızını sınırlayan makro gözenekli bir yapıdan yoksundur (29, 69).

Kalsiyum Sülfatlar: Kalsiyum sülfatlar, toz halinde kristalin bir yapı oluşturur (alfahemihidrat) (34, 35, 37). Rehidre edildiğinde, bu toz hemihidrat, kemik defektinin şeklini alarak sertleşen, işlenebilir bir macun oluşturabilir. Kalsiyum sülfat geçmişte kemik rejenerasyonu için osteokondüktif bir iskele olarak yaygın olarak kullanılmıştır (70, 71).

Polimerler: Sentetik polimerler ayrıca bozunabilir ve bozunamaz alt tipler olarak sınıflandırılabilir. Kemik rejenerasyonu için en yaygın olarak kullanılan polimerler arasında polilaktik asit, poliglikolik asit, polie-kaprolakton ve bunların kopolimerleri ve türevleri bulunur, bunlar topluca alifatik polyesterler olarak bilinir (15, 42) Bu malzeme grubu tarafından sergilenen başlıca avantajlar, özelleştirilebilir formları, düşük immünojenitesi, kontrol edilebilir rezorpsyonu, gözenekliliği ve fizikokimyasal yapısıdır (42, 69).

Metaller: Son araştırmalar, magnezyum (Mg), stronsiyum (Sr), çinko (Zn) ve silikon (Si) gibi metalik iyonların kemiğin korunmasında ve osteogenezin uyarılmasındaki rolünü tanımlamıştır (55). Diş alanında, iyi mekanik mukavemet, iyi biyouyumluluk, korozyon direnci ve elastik modül dahil olmak üzere çok sayıda arzu edilen özelliklerinden dolayı nikelitanyum malzemelerin kemik rejenerasyonu için kullanımı araştırılmıştır (69).

2.10 Amniyotik sıvı ve plasenta

Son yıllarda, plasenta, plasental membranlar, göbek kordonu ve amniyotik sıvı gibi gebelik dokusu, rejeneratif tıp alanında kullanılmayan bir kaynak olarak kabul edilmiştir. Bu dokuların, bu hücreleri hastalığın tedavisi için heyecan verici yeni bir

araç haline getiren güçlü immünosupresif özelliklere sahip, yüksek düzeyde multipotent kök hücrelerin zengin bir kaynağı olduğu gösterilmiştir (69, 72). İnsan amniyotik sıvısı, doğum öncesi tanıda >70 yıldır kullanılmaktadır. Bununla birlikte, amniyotik sıvının yalnızca bir tanı aracı olmaktan daha fazla faydası olabileceğine ve güçlü bir terapi kaynağı olabileceğine dair kanıtlar var.

Son zamanlarda, araştırmacılar amniyotik sıvı ve plasenta zarlarından yüksek düzeyde multipotent hücreleri izole etmiş ve karakterize etmişlerdir (69, 73). Amniyotik sıvıdan türetilen kök hücreler (AFSC'ler), amniyosentez sırasında elde edilen sıvının küçük bir miktarından izole edilebilir. Bu konjenital anormallikleri taramak için birçok gebelikte hâlihazırda uygulanan bir prosedürdür. Mezenkimal ve epitelyal kök hücreler, genellikle doğumdan sonra atılan plasenta ve plasenta zarlarından elde edilebilir. Bu kök hücre kaynaklarının avantajı, toplanmaları ve kullanımlarıyla ilgili etik ve yasal kaygıların olmamasıdır.

Bu tip hücrelerle yapılan hücre kültürü deneyleri, adipojenik, osteojenik, miyojenik, endotelial, pulmoner, nörojenik, hepatojenik, kardiyak ve pankreas soyları dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olabileceklerine dair kanıtlar sağlamıştır. Bu gestasyonel kök hücrelerin yüksek düzeyde multipotent ve antiinflamatuar özellikleri, Crohn hastalığı, akciğer hastalığı, diyabet, kemik hastalığı, kalp ve böbrek hastalıkları, nörolojik bozukluklar ve kan hastalıkları gibi rahatsızlıklarının tedavisi için potansiyel klinik uygulamalar önermektedir (37, 69, 73).

2.10.1 Amniyotik Sıvının Gelişim Biyolojisi ve Plasenta

Gastrulasyon, implantasyon sonrası erken gelişimde önemli (74). Yaklaşık 6.5. günde (E6.5) embriyonun arka bölgesinde gastrulasyon başlar. Pluripotent epiblast hücreleri, embriyonun üç ana germ tabakasına (ektoderm, mezoderm ve endoderm) tahsis edilir.

Germ hücreleri, yumurta sarısı kesesi, amniyon ve allantoisin ekstraembriyonik mezoderminin yanı sıra tüm fetal doku soylarının progenitörleridir (75, 76). Olgun korioallantoik plasentadaki labirent tabakasının mezenkimal kısmı kadar ve göbek

kordonunu oluşturur (30, 53, 76). Amniyotik kese, gelişmekte olan fetüsü doğumdan kısa bir süre öncesine kadar tutan sert ama ince şeffaf bir zar çiftidir. İç zar, amniyon, amniyotik sıvıyı ve fetüsü içerir. Dış zar, koryon, amniyonu sarar ve plasentanın bir parçasıdır. Amniyon ektoderm ve mezodermden türemiştir ve büyüdükçe sıvı ile dolmaya başlar (77). Başlangıçta bu sıvı izotoniktir. Proteinler, karbonhidratlar, lipidler, fosfolipidler, üre ve elektrolitler içerir. Daha sonra fetus tarafından atılan idrar hacmini artırır ve bileşimini değiştirir (78). Amniyotik sıvının varlığı simetrik yapı gelişimini ve büyümesini sağlar.

Ek olarak, embriyoyu yastıklar ve korur, tutarlı basınç ve sıcaklığın korunmasına yardımcı olur ve kas-iskelet gelişimi ve kan akışı için önemli olan fetal hareket özgürlüğüne izin verir. Fetus amniyotik sıvıda nefes alabilir ve akciğerlerin normal büyümesine ve gelişmesine izin verir.

Fetus ayrıca gastrointestinal sistem gelişimine katkıda bulunan amniyotik sıvıyı da yutar ve sonuç olarak sıvının bileşenleri fetal kan yoluyla anne kanına geçer. Amniyotik sıvı ayrıca farklı hücre tiplerinin bir karışımını içerir. Bu hücreler için birkaç farklı köken önerilmiştir. Amniyosentez donörünün bir erkek çocuğu taşıdığı vakalardan türetilen hücre dizilerinde bir Y kromozomunun varlığı, amniyotik sıvı hücrelerinin, gelişmekte olan fetüsten, fetal amniyon zarından ve deriden ve ayrıca beslenme, solunum sisteminden köken aldığı anlamına gelir (77, 78).

2.10.2 Amniyotik Sıvıdan ve Plasentadan Elde Edilen Hücreler Plasental Mezenkimal Hücreler

Mezenkimal stromal hücreler (MSC'ler) başlangıçta yetişkin deneklerin kemik iliğinde tanımlandı. MSC'ler kemik, kırıldak, kas, bağ, tendon, yağ ve stroma gibi mezenkimal dokuların yenilenmesine katkıda bulunur. MSC'ler ayrıca yağ dokusu, yetişkin kas, diş pulpası ve gestasyonal dokusu gibi diğer ilik olmayan dokulardan da elde edilmiştir. Son on yılda, birkaç grup, amniyotik sıvı ve plasentadan mezenkimal benzeri özelliklere sahip spesifik olmayan bir hücre popülasyonunu izole etmek için nispeten basit protokoller yayınladı. MSC'ler, kültürde osteositlere, kondrositlere ve adipositlere farklılaşır ve immünomodülatör özelliklere sahiptir (79, 80).

Amniyon Epitelial Hücreler

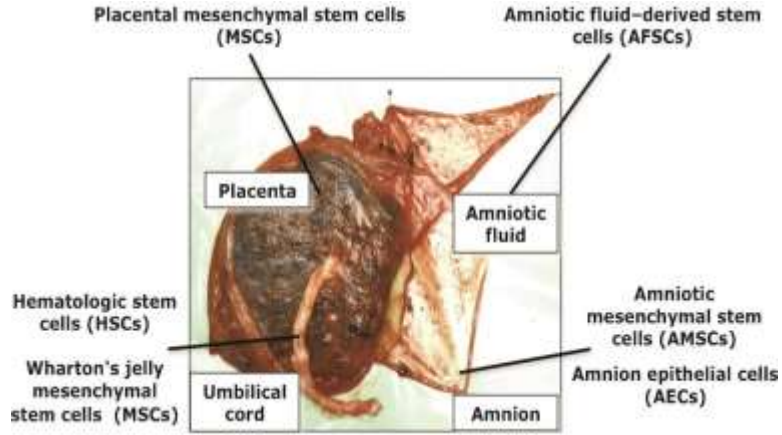
Amniyon zarından bir multipotent epitel hücre popülasyonu da izole edilmiştir. İnsan amniyon epitel hücreleri (hAEC'ler) rejeneratif terapiler için potansiyel bir hücre kaynağı olarak dikkat çekmiştir ve insan amniyondan türetilen epitel hücrelerinin multipotent farklılaşma kabiliyetine, düşük immünojenisiteye ve anti-inflamatuar fonksiyonlara sahip olduğunu bildirmiştir. Gelecekteki klinik uygulamalar açısından, hAEC'lerin klinik tedaviler için uygun bir şekilde toplanabileceğini, izole edilebileceğini ve saklanabileceğini göstermiştir.

Epitel hücreleri, hayvansal ürün içermeyen bir rekombinant tripsinler enzimatik sindirim yoluyla amniyondan izole edilir. Tek bir amniyon zarından yaklaşık 120 milyon canlı epitel hücresi izole edilebilir ve bu hücreler serumsuz kültür koşullarında tutulabilir ve uzun telomer uzunluğu korunurken kültür sonrası normal bir karyotip ve hücre döngüsü dağılımı gösterebilir. hAEC'ler plasental MSC'lerin proliferatif kapasitesinden yoksun olmalarına rağmen, yüksek düzeyde multipotentirler ve özellikle osteositler, adipositler, nöronlar, akciğer epitel hücreleri, kardiyomyositler, miyositler, hepatositler ve pankreas hücreleri olmak üzere üç germ tabakasının tümünü temsil eden hücrelere farklılaşırlar.

hAEC'lerin immünosupresif özellikleri hem in vitro hem de in vivo olarak iyi karakterize edilmiştir. hAEC'ler tarafından üretilen çözünür faktörlerin anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu ve hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sistemlerini inhibe ettiği öne sürülmüştür. Bu nedenle hAEC'ler, çok sayıda konjenital ve yetişkin bozukluklar için klinik hücre tedavisi olarak önemli uygulamalara yardımcı olabilir (79, 80)

Amniyotik Sıvı Kök Hücreleri

AFSC'ler, ikinci trimesterde amniyosentez sırasında az miktarda sıvıdan elde edilebilir. Ayrıca rutin sezaryen doğumlarından amniyotik sıvı toplama potansiyeli de vardır. Kaviani ve çalışmaları, yalnızca 2 mL amniyotik sıvının, %80'i canlı olan 20.000'e kadar hücre içerdiğini bildirdi. Amniyotik sıvıda ve plasentada bulunan AFSC'lerin, membran reseptörü c-kitini (CD117) eksprese eden hücreler için pozitif seçim yoluyla izole edilebilir. C-kit, embriyonik kök hücreler (ESC'ler), ilkel germ hücreleri ve birçok somatik kök hücre dahil olmak üzere çeşitli kök hücrelerde eksprese edilir (79).



Şekil 4 Kök hücre kaynağı olarak gebelik dokusu

3. MATERYAL VE METOT

Tez çalışmamız, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından 2022-TDR-SABE-0007 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmamızın etik kurul onayı, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2021-088 numarası ile verilmiştir (Ek 1). Çalışmamızın deneysel aşamaları Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde , histopatolojik incelemeleri ise İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu çalışmanın deneyleri tavşan kalvaryumunda açılmış olan kritik boyutlu kemik defekleri üzerinde yapılmıştır.

Yapılan tüm işlemlerde deneklerle ilgili Yerel Etik Kurul Yönergesi'ne riayet edilmiş ve belirtilen şartlar sağlanmıştır.

3.1 Çalışma Grupları

Çalışma, ortalama yaşı 7 aylık ve ortalama ağırlığı 3-4 kg olan 24 erkek ve dişi Yeni Zelanda tavşanı üzerinde gerçekleştirildi. Tavşanlar Aykut Bolu Deneysel Hayvan Üretim ve Tedarik Merkezi'nden (ABDEHAM) temin edildi. Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulamaları ve Araştırmaları Merkezi'nden muhafaza edilip aynı kurumun laboratuvarında cerrahi operasyonlar gerçekleştirildi. Bu tavşanların mümkün olan en iyi koşullarda stressiz bir ortama sahip olmalarını sağlamak için büyük özen gösterildi. Her biri, yiyecek ve suya kolay erişimi olan ayrı bir kafeste tutuldu.

Ayrıca, hareket etmek için yeterli hareket olanağına sahip olan denekler, sıcaklığın 22 +/- 2 °C olduğu bir alanda tutuldu. Standart laboratuvar diyetinin bir parçası olarak kuru peletlerle beslendiler ve ihtiyaçlarını karşılamak için 12 saat aydınlık ve karanlık sağlandı.

Çalışmada 24 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Toplam 24 tavşan;

Her tavşanın iki parietal kemiğinde 6 mm çaplı 1.0-2.0 mm derinliğinde dairesel 4 adet kritik boyutta defekt hazırlandı.

Defektlere göre;

- Grup I (n=24) serum & xenogreft (kontrol) grubu,
- Grup II (n=24) amniyotik sıvı & xenogreft grubu,
- Grup III (n=24) amniyotik plasental membran & xenogreft grubu,
- Grup IV (n=24) amniyotik sıvı & amniyotik plasental membran & xenogreft grubu

Sakrifikasyon sürelerine göre:

Erken Grup (n=12) 6 dişi 6 erkek erken kemik iyileşme grubu,

Geç Grup (n=12) 6 dişi 6 erkek geç iyileşme grubu

Tavşanların yarısı 4. hafta diğer yarısı ise 12. haftada sakrifiye edildi. Çalışmamızda bir tavşan kısa dönem grubundan ve bir tavşan uzun dönem grubundan öldüğü için çalışmamız 22 tavşan ile tamamlanmıştır. 11 tavşan erken dönemde, 11 tavşan geç dönemde sakrifiye edildi. Kullanılan xenogreftin markası: **Bio-Oss** Granül boyu: **0,25-1mm**

3.2 Cerrahi Protokol

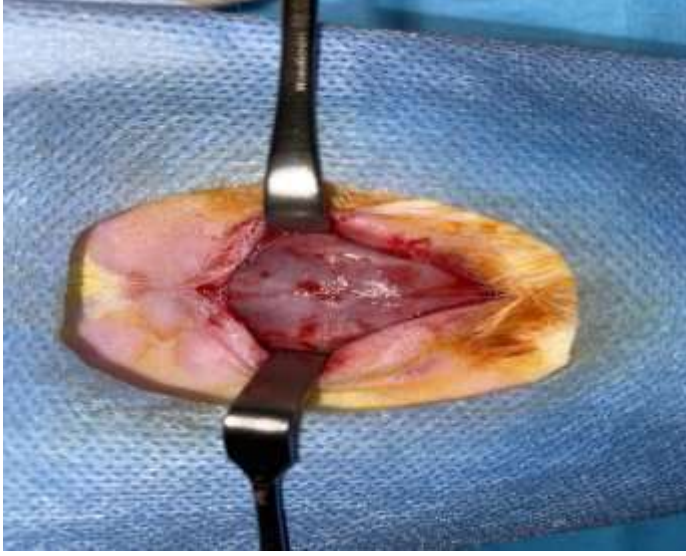
Deney hayvanlarına cerrahi işlemlerden önce ketamin HCL(50 mg/kg-Alfamine®) ve ksilazin HCl (3 mg/kg-Rompun®) verilerek genel anestezi sağlandı. Genel anestezi sağlandıktan sonra kulaklara kadar her iki hemikranyumu kapatacak şekilde traş edildi. (resim 1) Cerrahi alan povidon iyot ile temizlendikten sonra uygun steril alan örtüsü uygulandı. Kranial yumuşak doku orta hattı 15 numara bisturi ile periostu da içine alan sagittal bir kesi ile kesilerek yumuşak doku subperiosteal düzlemden her iki taraftan açılarak her iki hemikranium tamamen görünecek şekilde ekartörler yerleştirildi ve ameliyat sahası hazırlandı. (resim 2) Her tavşanın iki parietal kemikte 6 mm çaplı 1.0-2.0 mm derinliğinde dairesel 4 adet kritik boyutta defekt hazırlandı. (resim 3)

Her bir defekte sırasıyla: serum & xenogreft, amniyotik sıvı & xenogreft , amniyotik plasental membran & xenogreft , amniyotik sıvı & amniyotik plasental membran & xenogreft uygulandı. (resim 4) Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra periost 4/0 glikolid bazlı emilebilir suture (Vicryl, Ethicon, Brussels, Belgium) ile dikildi (resim 5) ve ardından cilt dokusu 3/0 glikolid bazlı emilebilir suture (Vicryl) ile dikildi. (resim 6) Basit suture tekniği kullanılmıştır. Ameliyat sonrası enfeksiyon kontrolü için enrofloksasin (Baytril-K® 2.5 mg/kg IM) ve ameliyat sonrası ağrı olmaması için meloksikam (Maxicam® 1 mg/kg IM) enjekte edildi. Tavşanlara ameliyat sonrası 5 gün boyunca enfeksiyon kontrolü için günde bir kez enrofloksasin (Baytril-K® 2.5 mg/kg IM) ve meloksikam (Maxicam® 1 mg/kg IM) enjekte edildi. Oniki denek 4. haftada sakrifiye edildi, kalan 12 denek 12. haftada sakrifiye edildi ve deney toplam 12 hafta sürdü.

Deneklerin yarısı (12 denek) 4. haftanın sonunda ve diğer yarısı 12. haftanın sonunda, %2 Xylazine hydrochloride (Rompun)® 30 mg/kg IM ve %10 Ketamin hydrochloride (Alfamine®) 70 mg/ kg IM enjeksiyon ile sakrifiye edildi.



Resim 1 Tavşan kafa derisi traş edildikten sonra alınan görüntü



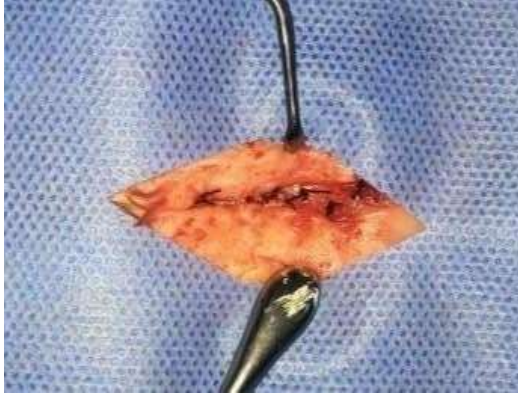
Resim 2 Kafa derisi insizyonu ve paryetal kemiğin görüntüsü



Resim 3 Hazırlanan defektlerin görüntüsü



Resim 4 Deney gruplarının görüntüsü (sol üst defekt: serum+ksenogreft, sol alt defekt: amniotik plasental membran+ksenogreft, sağ alt defekt: amniotik sıvı+amniotik plasental membran+ksenogreft, sağ üst defekt: amniotik sıvı+ksenogreft)



Resim 5 Periostun 4-0 emilebilen suture ile suture edilmiş görüntüsü



Resim 6 Kafa derisinin 3-0 emilebilen suture ile kapatılması

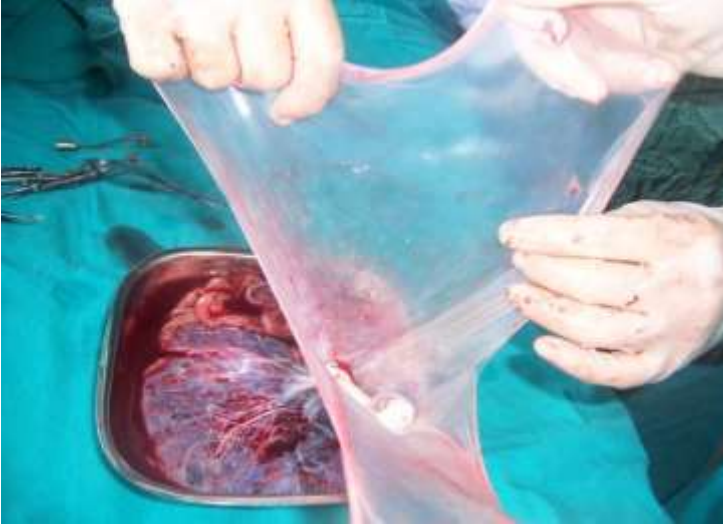
3.2.1. Plesental Amniyotik Membranın Elde Edilmesi ve Uygulanması

Plesental Amniyotik membran, İzmir Bozyaka Eğitim Araştırma Hastanesi laboratuvarında, kontaminasyon riski daha az olan sezeryan ile doğum yapmış olan gebenin plesantasından hazırlandı. Hepatit virüs tip B ve tip C, sifiliz, HIV tip 1 ve tip 2 gibi bulaşıcı hastalıkları açısından serolojik testler yapıldı. Tbc, bruselloz, otoimmün hastalıklar, MS gibi hastalıkların donörde olmamasına dikkat edildi.

Plesanta steril koşullarda alınıp, dengeli tuz solüsyonu ile yıkanarak kanama ve debrislerden temizlendi. Amniyotik membran korion tabakasından ayrıldı. (resim 7,8)



Resim 7 Plasentanın serum fizyolojik ile yıkanması



Resim 8 Amniyotik membran koryon tabakasından ayrılması

Antibiyotikler (50 ugr/ml penisilin, 50 ugr/ml streptomisin, 50 ugr /ml gentamisin ve 2.5 ugr/ml amfoterisin B)) eklenen serum fizyolojik ile yıkandı. Eagle dengeli tuz solüsyonunda yarım saat bekletildi. (resim 9,10)



Resim 9 Amniyotik membranın solüsyonda bekletilmesi.



Resim 10 Amniyotik membranın çıkarılması

Dondurarak saklama işleminde membran epitel-bazal membran yüzü (parlak yüzü) yukarı gelecek şekilde nitroselüloz kağıtlara yayıldı. (resim 11, 12) Kağıtlar 3 x 3cm boyutlarında kesilerek 1/1 oranında Dulbecco's Modifiye Eagle solüsyonu (Suneelkumar et al. 2008) ve gliserol karışımlarının bulunduğu petri kaplarına yerleştirilerek, -80 °C' de derin dondurucuda saklandı. (resim 13) Uygulama sırasında derin dondurucudan çıkarılan membranlar, oda sıcaklığında bekletilerek uygulama için hazır hale getirildi.



Resim 11 Steril örtüde bulunan amniyotik membran



Resim 12 Nitrosellüloz kağıt örneği



Resim 13 Petri kabında dondurucuya girmeye hazır membranlar

3.2.2. Amniyotik sıvının preparasyonu.

Amniyotik sıvı hazır olarak AMSBİO firmasından -20 derecede saklanarak kurumumuza kuru buz içinde kargolandı. Kullanım öncesi oda sıcaklığında uygulanacak kıvama geldi. (resim 14)



Resim 14 Amniotik sıvı preparatı

3.3 Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

3.3.1. Rutin Doku Takibi

Yüksek doz anestezi verilerek sakrifiye edilen tavşanların kafatası steril koşullarda açılarak kranyumdan kemik dokusu örnekleri çıkarıldı. Alınan tüm dokular %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

Dokular formaldehit solüsyonunda takip edildi ve doku takibi doku takip cihazında otomatik olarak gerçekleştirildi. Parafine gömme işlemi ile dokular parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklardan, mikrotomda 0.5 µm kalınlığında rodajlı ve lizimli lamlara kesitler alındı. Kesitler kuruduktan sonra deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra rodajlı lamlara alınan dokulara rutin histolojik Hematoksilen & Eozin yapıldı.

3.3.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Tavşan calvaryumdan alınan kemik dokusu kesitleri 2x30 dakika ksilende bekletildi.

Sırasıyla %95, %80, %70, %60'lik alkol serilerinden geçirildi. Ardından 5 dakika akar suda yıkandı. 5 dakika boyunca hematoksilende bekletildi. Yıkaması için 5 dakika akar suda tutulduktan sonra asit-alkol solusyona batırılıp çıkarıldı. Tekrar 5 dakika boyunca suda yıkandı.

Eozinde 5 dakika bekletmesinden ardından 5 dakika daha akar suda yıkandı. 1'er dakika %80 ve %95'lik alkolde bekletildi ve sonra tam 1 saat boyunca ksilende bekletildi. Son olarak kesitlerin entellan kullanılarak lamelle kapatıldı ve ışık mikroskopik olarak incelemeye hazır hale getirildi.

3.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Lizinli lamlara alınmış dokularda gerçekleştirilen immunohistokimyasal işlem:

1. 3 kez 5 dk. PBS ile yıkama.
2. 5 dakika %3 lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması
3. 3 defa PBS ile yıkama
4. Permeabilizasyon için %0,1'lik Tripsin ile 15 dakika inkübasyon
5. 3 defa PBS ile yıkama
6. 1 saat bloklama uygulaması
7. Anti-osteocalcin (catalog no: sc-365797) ve anti-alkaline phosphatase (catalog no: sc-166261) antikorları ile 1 gece inkübasyon (Santa Cruz; Mouse anti-osteocalcin monoclonal IgG₃ ve mouse anti-alkaline phosphatase monoclonal IgG₁)
8. 3 defa PBS ile yıkama
9. İkincil antikorlar biotin (30 dakika) ve ardından streptavidin (30 dakika) uygulaması
10. İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra 3 defa PBS ile yıkama
11. DAB kromojeninin uygulanması ile immunoreaktivitelerin görünürlüğünün sağlanması
12. İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrılmış ve primer antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirilmiştir.
13. Distile su ile yıkanan örnekler kapatma mediumu damlatılması ve kapama yapılması
14. Kesitlerin ışık mikroskopik fotoğraflarının çekilmesi

İncelemelerde DAB kromojeni yoğun olarak almış hücreler pozitif kabul edildi. Skoring şu şekilde yapıldı. İncelemelerde pozitif hücre olmaması durumunda skor 0. Pozitif hücrelerin boyanmayan hücrelere oranı az ise skor 1. Pozitif hücreler ile boyanmayan hücrelerin oranı eşit veya yakın ise skor 2. Pozitif hücrelerin boyanmayan hücrelere göre yoğunluğu daha fazla ise skor 3. (Tablo 1)

Tablo 1: İmmünohistokimyasal skorlamanın gösterilmesi

Skor	0	1	2	3
Boyanma	Boyanma yok	Az Boyanma	Orta düzeyde boyanma	Yoğun boyanma

3.4 İstatistiksel Analiz

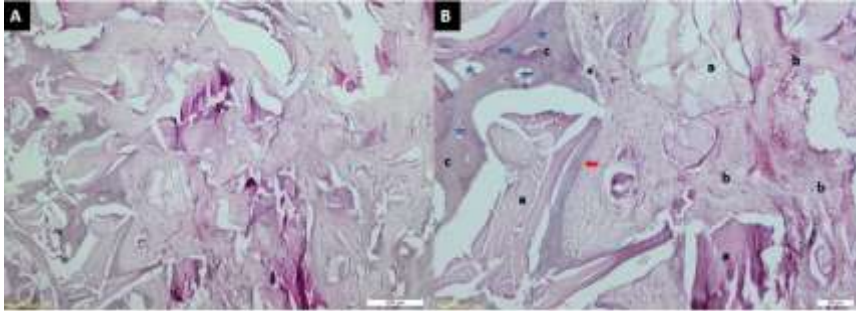
Verilerin çözümlenmesinin ilk adım olarak normallik varsayımı Shapiro Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma sahip olan bağımsız iki grup arası ortalamaları farkının incelenmesi için Bağımsız Örneklem T testi uygulandı. Normal dağılıma sahip olmayan bağımsız iki grup arası ortalamaları farkının incelenmesi için Mann Whitney U testi uygulandı.

Normal dağılıma sahip olmayan bağımsız ikiden çok gruba sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki farkın incelenmesi için Kruskal Wallis testi yapıldı. Farkı yaratan grup ya da grupların belirlenmesi için Post Hoc Bonferroni testi kullanıldı. Örneklem boyutu varsayımının sağlanmadığı durumlarda ($n < 5$) Fisher's Exact testi kullanıldı. Analizler IBM SPSS Statistics 25 programında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

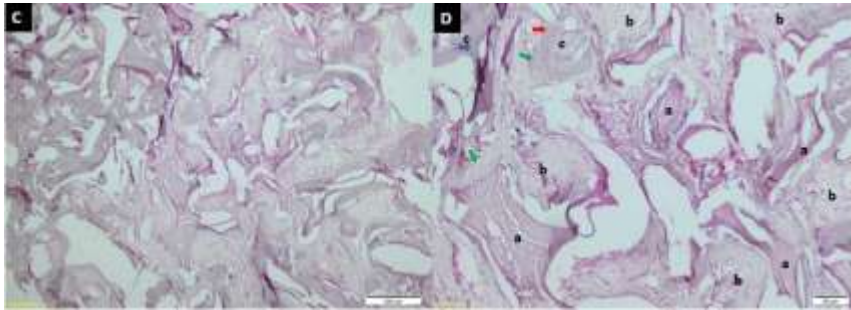
4.1 Histopatolojik Bulgular

Erken Deney Grupları



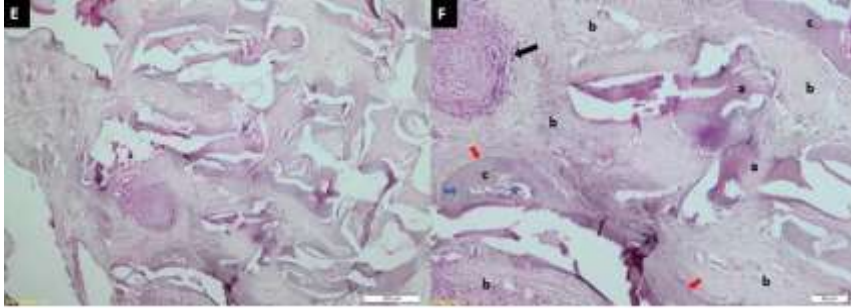
Resim 15 Erken serum; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok :osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız :havers kanallarını, * :howship lakünası içindeki osteoklastı göstermektedir (H&E; x4, x10).

Erken serum grubunun histolojik analizlerinde yoğunluklu olarak kan damarlarının, fibroblastların ve mezenşim hücrelerinin bulunduğu bağ doku ve çok az da yeni kemik oluşumu görülmektedir (Resim 15).



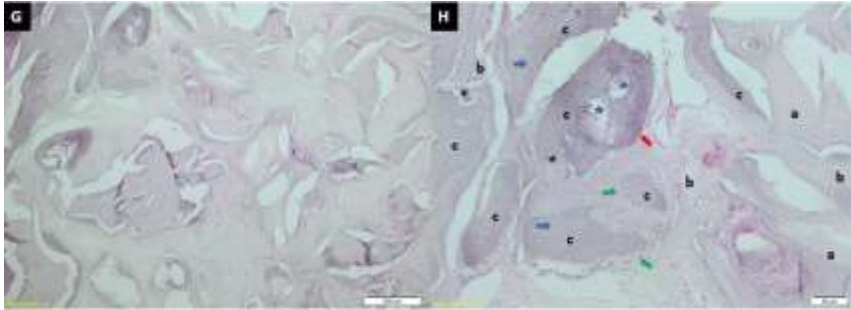
Resim 16 Erken amniyotik sıvı; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok osteosit, kırmızı ok osteoblast, yeşil ok osteoprogenitör hücreleri göstermektedir (H&E; x4, x10).

Erken amniyotik sıvı grubunda yoğunluklu olarak bağ doku olmakla birlikte yeni kemik oluşumu görülmekte ve az miktarda bulunan greftte boş lakünalar izlenmektedir (Resim 16).



Resim 17 Erken amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yeşil ok: osteoprogenitör hücreleri, siyah ok: inflamasyon odağını, yıldız havers kanalını göstermektedir (H&E; x4, x10).

Erken amniyotik plasental membran grubunda greft ve bağ doku eşit miktarda bulunmakla birlikte çok az miktarda da yeni kemik oluşumu görülmektedir. Rezidüel greftler rezorpsiyona uğramış gibi görünmektedir. Aynı zamanda inflamasyon odakları da görülmektedir (Resim 17).



*Resim 18 Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yeşil ok: osteoprogenitör hücreleri, siyah ok: inflamasyon odağını, yıldız: havers kanallarını, *: howship lakünası içindeki osteoklastları gösterir*

Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran grubunda diğer erken gruplara göre daha fazla yeni kemik oluşumu görülmektedir. Yeni kemiğin çevresinde

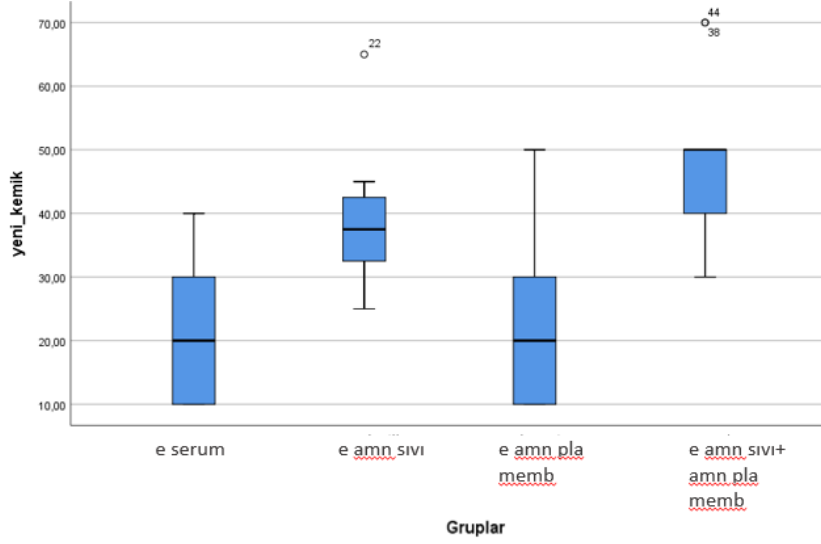
osteoblastlar ve iç kısmında lakünalar içinde osteositler gözlenmektedir. Mezenşim ve osteoprogenitör hücreleri içeren bağ doku yoğunluğu da rezidüel grefte göre daha fazladır (Resim 18).

Tablo 2: Erken gruplarının hematoksilen-eozin boyamalarında greft, bağ doku ve yeni kemik oranlarının karşılaştırılması

	Gruplar				Test İstatistikleri	
	Serum (<i>n</i> =12)	Amniyotik sıvı (<i>n</i> =12)	Amniyotik Plasental Membran (<i>n</i> =12)	Amniyotik sıvı + Amniyotik Plasental Membran (<i>n</i> =12)	Test Değeri	<i>p</i> Değeri
Rezidüel greft oranı (%)	20(20) ^a	15(5) ^a	40(15) ^b	10(20) ^a	<i>H</i> =11,867	<i>p</i> =0,008
Bağ doku oranı (%)	50(30) ^a	45(17,50) ^b	40(7,50) ^b	40(12,50) ^b	<i>H</i> =8,208	<i>p</i> =0,042
Yeni kemik oranı (%)	20(20) ^a	37,5(12,50) ^b	20(27,50) ^a	50(25) ^b	<i>H</i> =14,541	<i>p</i> =0,002

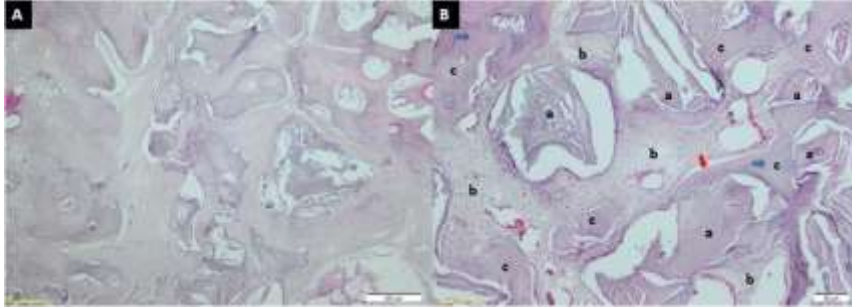
n: Barın sayısı, *M*: Ortanca, *IQ*: Çeyreklikler arası uzaklık, *H*: Kruskal-Wallis testi, *p*<0,05 anlamlılık düzeyi.

Erken gruplarının hematoksilen-eozin boyamalarında rezidüel greft oranları karşılaştırıldığında erken plasenta grubunun rezidüel greft oranı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksektir. Erken kontrol grubunun bağ doku oranı ise diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazladır. Yeni kemik oluşma oranı ise en fazla erken amniyotik sıvı+amniyotik plasental membran grubunda, daha sonra erken amniyotik sıvı grubunda görülmektedir. Erken kontrol grubu ve erken amniyotik plasental membran grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tablo 2 ve İkil 5'e göre erken gruplar arasında kemikleşme oranı en iyi olan grubun erken amniyotik sıvı+amniyotik plasental membran grubu olduğu görülmüştür.



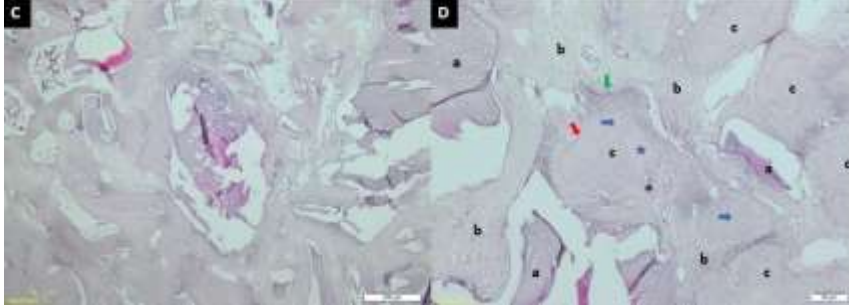
Şekil 5 4. Hafta kemikleşme ölçümlerinin gruplara göre dağılımı

Geç Deneş Grupları



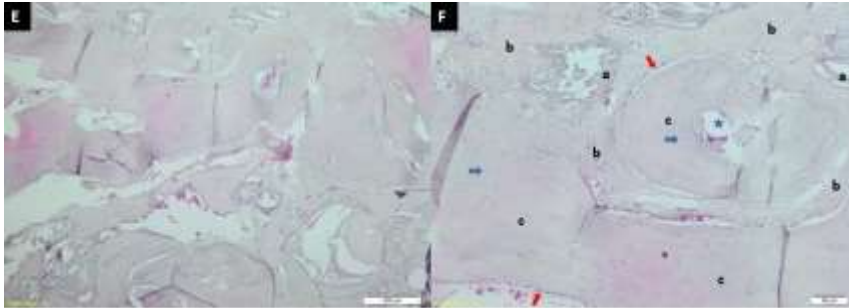
Resim 19 Geç serum; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok osteosit, kırmızı ok osteoblast, yeşil ok osteoprogenitör hücreleri göstermektedir (H&E; x4, x10).

Geç serum grubunda greft, bağ doku ve yeni kemik oluşumu yüzdeleri birbirine yakın gözlenmektedir (Resim 19).



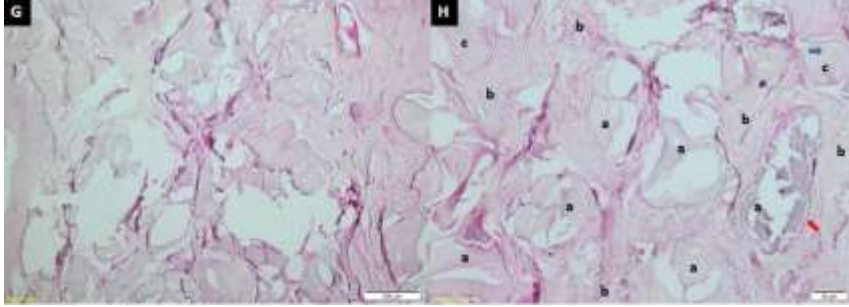
*Resim 20 Geç amniyotik sıvı; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok osteosit, kırmızı ok osteoblast, yeşil ok osteoprogenitör hücreleri, yıldız havers kanallarını, * howship lakünası içindeki osteoklastı göstermektedir (H&E; x4, x10).*

Geç amniyotik sıvı grubunda birbirine yakın bağ doku miktarı ve yeni kemik oluşumu ve az miktarda greft görülmektedir (Resim 20).



Resim 21 Geç amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok :osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız: havers kanalını göstermektedir (H&E; x4, x10).

Geç amniyotik plasental membran grubunda ise yüksek düzeyde yeni kemik oluşumu ve daha az miktarda bağ doku ve greft görülmektedir. Yeni kemiğin çevresinde sıralı bir şekilde dizilmiş osteoblastlar, içinde ise laküna içinde olmak üzere çok sayıda osteosit hücresi görülmektedir. Havers kanalı da oluşmuş durumdadır (Resim 21).



Resim 22 Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran; a: greft, b: bağ doku, c: yeni kemik. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast göstermektedir (H&E; x4, x10).

Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran grubunda ise diğer gruplardan daha az düzeyde yeni kemik oluşumu gözlenmektedir. Yoğunluğu greft ve bağ doku oluşturmaktadır. Greftlerin büyük bir kısmı rezorpsiyona uğramış gibi görünmektedir ve içi boş lakünalar izlenmektedir (Resim 22).

Tablo 3: Geç gruplarının hematoksilen-eozin boyamalarında greft, bağ doku ve yeni kemik oranlarının karşılaştırılması

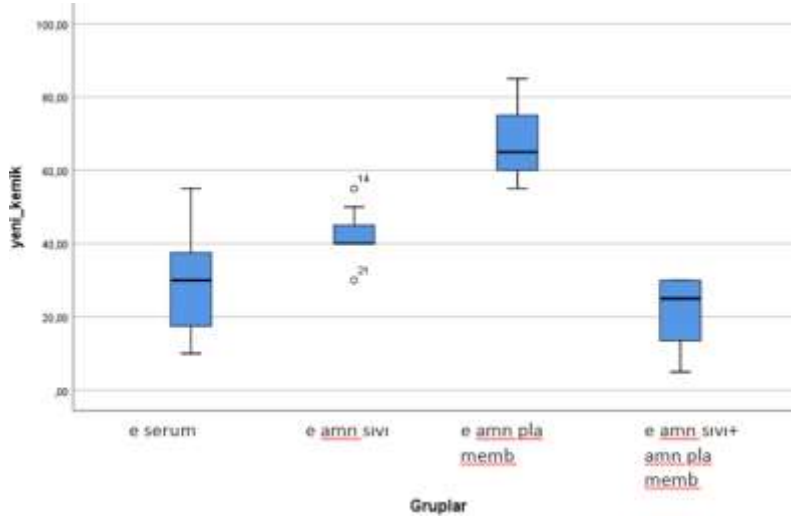
	Gruplar				Test İstatistikleri	
	Serum (n=12)	Amniyotik sıvı (n=12)	Amniyotik Plasental Membran (n=12)	Amniyotik sıvı + Amniyotik Plasental Membran (n=12)	Test Değeri	p Değeri
Rezidüel greft oranı (%)	30(5) ^a	15(10) ^a	10(5) ^a	35(14,75) ^a	H=28,869	p<0,001
Bağ doku oranı (%)	40(20) ^a	50(15) ^a	20(10) ^a	40(5) ^a	H=21,364	p<0,001
Yeni kemik oranı (%)	30(25) ^a	40(7,5) ^a	65(20) ^a	25(19,75) ^a	H=29,574	p<0,001

^a Birim sayısı, ^M Ortanca, ^{QR} Çeyrekler arası uzaklık, ^H Kruskal-Wallis testi, p<0,05 anlamlılık düzeyi.

Geç gruplarının hematoksilen-eozin boyamalarında rezidüel greft oranları karşılaştırıldığında geç kontrol ve geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran gruplarının rezidüel greft oranları geç amniyotik sıvı ve geç amniyotik plasental membran gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksektir. Bağ doku oranlarına

bakıldığında ise geç amniyotik plasental membran grubunun bağ doku oranları diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Yeni kemik oluşma oranı ise geç amniyotik plasental membran grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha fazladır.

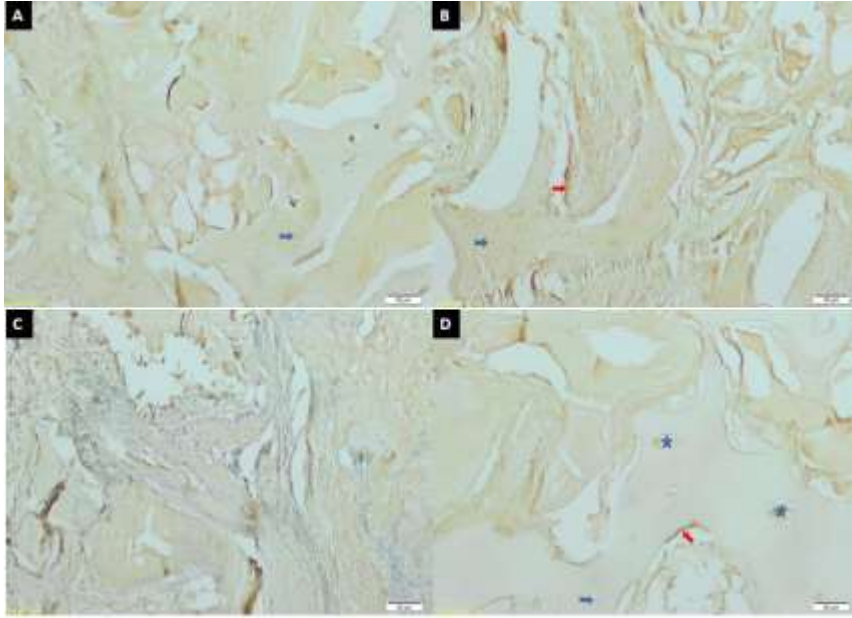
Tablo 2 ve İekil 6'ya göre kemikleşmenin en iyi gerçekleştiği grup geç amniyotik plasental membrandır.



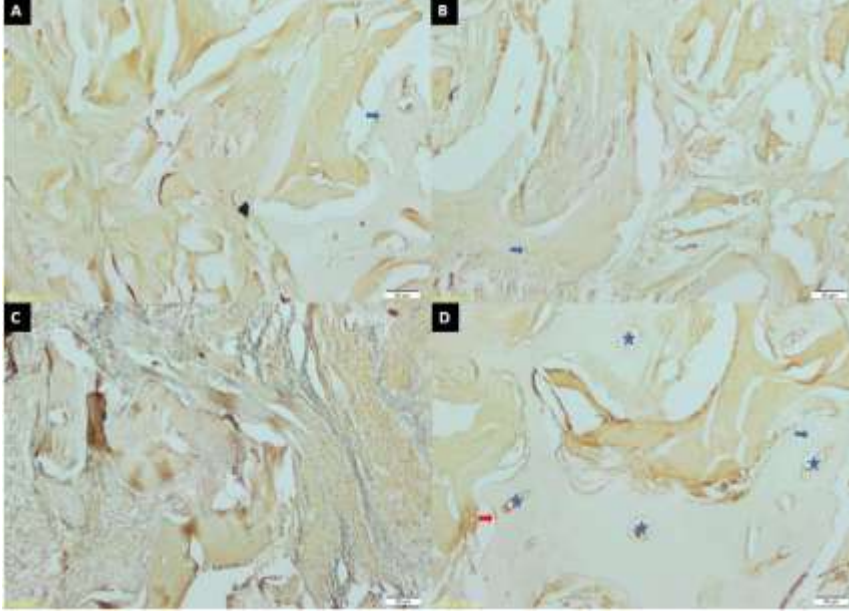
Şekil 6 12. Hafta kemikleşme ölçümlerinin gruplara göre dağılımı

4.2 İmmünohistokimyasal bulgular

Erken Deney Gruplarının ALP ve OCT Boyamaları



Resim 23 A: Erken serum, B: Erken amniyotik sıvı, C: Erken amniyotik plasental membran, D: Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız: havers kanallarını göstermektedir (IHC ALP, x10).



Resim 24 A: Erken serum, B: Erken amniyotik sıvı, C: Erken amniyotik plasental membran, D: Erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız :havers kanallarını göstermektedir (IHC OCT, x10).

Grupların immünohistokimyasal sonuçları değerlendirildiğinde, erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran grubunun diğer erken dönem gruplarına göre daha fazla alkalen fosfataz ve osteokalsin boyanmasına sahip olduğu görülmüştür (Resim 23, 24).

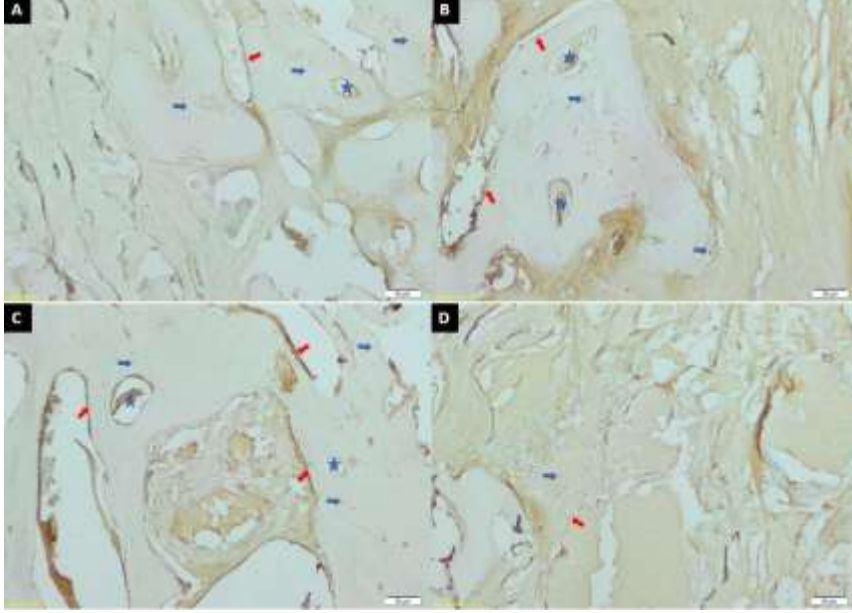
Tablo 4: Erken gruplarının IHC boyamaları

	Gruplar				Test İstatistikleri	
	Serum (n=12)	Amniyotik sıvı (n=12)	Amniyotik Plasental Membran (n=12)	Amniyotik sıvı + Amniyotik Plasental Membran (n=12)	Test Değeri	p Değeri
Alkalen Fosfataz (ALP)	0(1) ^a	1,5(1) ^a	1(1) ^a	2(0,5) ^b	H=13,093	p=0,004
Osteokalsin (OCT)	1(2) ^a	0,5(1,25) ^a	0(1) ^a	2(1,25) ^b	H=10,570	p=0,014

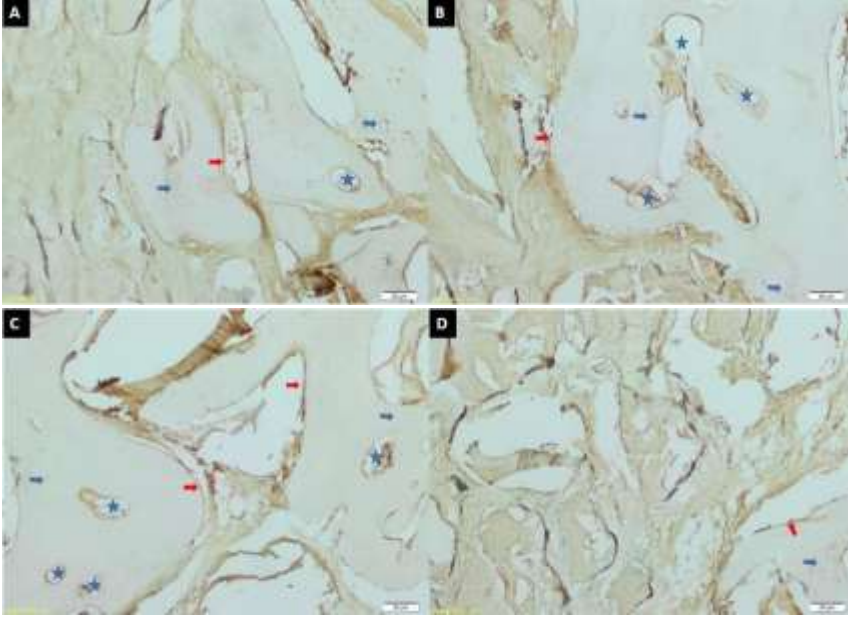
n: Birim sayısı, M: Ortanca, IQR: Çeyreklikler arası uzaklık, H: Kruskal-Wallis testi, p<0,05 anlamlılık düzeyi.

Erken gruplarının immünohistokimyasal boyamalarında erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran grubunun diğer gruplara kıyasla ALP ve osteokalsin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4).

Geç Deneç Gruplarının ALP ve OCT Boyamaları



Resim 25 A: Geç serum, B: Geç amniyotik sıvı, C: Geç amniyotik plasental membran, D: Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız: havers kanallarını göstermektedir (IHC ALP, x10).



Resim 26 A: Geç serum, B: Geç amniyotik sıvı, C: Geç amniyotik plasental membran, D: Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran. Mavi ok: osteosit, kırmızı ok: osteoblast, yıldız: havers kanallarını göstermektedir (IHC OCT, x10).

Geç gruplar arasında geç amniyotik plasental membran grubu daha yoğun alkalen fosfataz ve osteokalsin boyanması göstermiştir (Resim 25,26).

Geç amniyotik plasental membran grubunda yeni kemik oluşumu çok fazla olduğundan burada görülen osteosit ve osteoblast miktarı da yükündür. Bu nedenle bu hücrelerin boyanması yine yoğun bir şekilde görülmektedir. Geç amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran grubunda ise kemik oluşumu görülmediğinden burada hücrelerin boyanma miktarından da bahsedilememektedir.

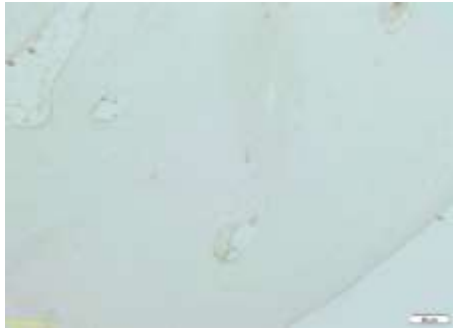
Tablo 5: Geç gruplarının IHC boyamaları

	Gruplar				Test İstatistikleri	
	Serum (n=12)	Amniyotik sıvı (n=12)	Amniyotik Plasental Membran (n=12)	Amniyotik sıvı + Amniyotik Plasental Membran (n=12)	Test Değeri	p Değeri
<u>Alkalen Fosfataz (ALP)</u>	1(1) ^a	2(0) ^a	3(1) ^b	1(1) ^a	H=13,539	p=0,004
<u>Osteokalsin (OCT)</u>	0(1) ^a	2(0) ^a	2(1) ^b	1(2) ^a	H=18,287	<0,001

n: Birim sayısı, M: Ortanca, IQR: Çeyreklikler arası uzaklık, H: Kruskal-Wallis testi, p<0,05 anlamlılık düzeyi.

Geç gruplarının immünohistokimyasal boyamalarında geç amniyotik plasental membran grubunun diğer gruplara kıyasla hem ALP hem OCT düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 5).

Negatif kontrol, immünohistokimyasal boyama esnasında antikor koyulmayan preparattır. Hücrelerin boyanmaması beklenir. İmmünohistokimyasal boyamalarında kullanılan kitin doğru çalıştığını ve yalancı boyanmalara sebep olmadığını göstermek amacıyla negatif kontrol preparatı kullanılır (Resim 27).



Resim 27 Negatif kontrol (IHC, X10)

5. TARTIİMA

Çene-yüz cerrahisi araştırmaları için çok sayıda hayvan türü kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, geçmişten günümüze sıçan, tavşan, domuz, koyun ve köpeklerin bu çalışmalarda kullanıldığını göstermektedir. Bakım kolaylığı ve yüksek verim nedeniyle çalışmalarda tavşan ve sıçanlar sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca üretimleri daha ucuzdur, bu da onları diğer türlere kıyasla daha uygun maliyetli hale getirir. Tavşan, kalvaria defekt modelleri için en yaygın kullanılan hayvandır. Tavşan kalvaryal kemik yapısının maksillaya benzer olması, kritik kemik defektleri için uygun bir model olarak tercih edilmesine sebep olmaktadır. Sıçan ve kobay kafataslarının küçük boyutta olması, onların büyük ve çoklu defektler için uygun olmamasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, köpeklerin büyük boyutta olması nedeniyle kritik bir modelde bakımını imkansız kılmaktadır. Ek olarak, tavşanların kafatası bölgesinde zayıf bir damarsal beslenme olduğundan, tavşanlar diğer hayvan modellerine göre daha düşük iyileşme potansiyeli göstermektedir (33).

Tavşan kemiği üzerinde çalışan araştırmacılar, kalvaryal kemik defektleri üzerinde çalışmayı tercih etmektedirler; tavşan kemiğinde belirli boyutta defektlere erişmenin ve yaratmanın kolay olduğunu düşünmektedirler. Bazı araştırmacılar bu defektlerin doğru boyutu konusunda hemfikir değildir ve kemik dokusunu incelerken kritik boyuttaki defektlerin kullanılmasını önermektedir. Tavşan kalvaryal defekt modelinde çeşitli büyüklükteki defektler incelenmiştir. Bu defektler modelde oluşturulmuş ve zaman içinde araştırılmıştır. Çalışmalarda 15mm çapında bir defekt önerilmiştir; ancak 8 haftaya iyileşmeye bırakılan 10mm, 9mm, 8mm, 6.5mm, ve 5mm defektlerin iyileşmesini ve kemik oluşumunu inceleyen araştırmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalara göre, 5 mm'den büyük herhangi bir defekt, herhangi bir iyileşme süreci veya prosedüründen bağımsız olarak, bireyin yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşmemektedir. (81)

Meikle ve ark. (82) alışmalarında tavşan kalvaryasında oluşun 5 mm çapındaki defektlerin kemik iyileşmesini test etmek için yeterli olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak literatür taramasından sonra, tavşan kafatasındaki 5 mm ve daha büyük çaptaki defektlerin 8 haftalık çalışmalar için uygun olduğu görülmektedir. Bu nedenle

çalışmamızda tavşanın kalvaryumunda 4 adet kavite açılması planlandığı için 6 mm çapındaki kafatası defektlerinin uygun olacağı, daha büyük çaplı defektler için kemik alanının yetersiz olduğu kanaatine varılmıştır. Çalışmamızda kavite hazırlamak için trefan frez kullanılmıştır. Kemik dokusunda ısıya bağlı nekroz oluşturmamak için serumla soğutma uygulanmış ve dura matere zarar vermeden özenle çalışılmıştır.

Kemik dokusu, maksillofasiyal cerrahinin ana araştırma alanlarından biridir. Çene cerrahisinde diş çekimi, gömük diş cerrahisi, kist cerrahisi, kırık tedavisi, implant tedavisi, sinüs lifting, kemik augmentasyonu gibi kemiğe yönelik işlemlerin başarısı kemik iyileşmesine bağlıdır. Greft materyalleri, oluşan boşlukların onarımı ve dental implantasyon için gerekli olan augmentasyon yöntemlerinde rutin olarak kullanılmaktadır (83). Maksillofasiyal cerrahide kullanılan otolog greftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik greftler farklı özelliklere sahiptir. Bu greft materyalleri, osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon gibi en az bir veya daha fazla özelliğe sahip olabilir.

Otojen greftler, altın standart greft malzemeleridir, ve cerrahların greftlerde aradığı tüm özelliklere sahiptir. Böyle bir malzeme canlı dokudan elde edilir ve kemiğe dönüşebilme avantajına sahiptir. Bu materyal, başka hiçbir greft materyalinin yapamayacağı yeni kemik oluşturma kabiliyeti nedeniyle üstün kabul edilir. Ancak; ikinci bir cerrahi alan gerektirmesi, enfeksiyon riskini arttırması ve donör dokusunun mevcudiyeti ile sınırlı olması gibi bazı kısıtlamalar otojen kemik greftlerinin daha geniş çapta kullanılmasını engeller.

Otolog kemik greftlerinin dezavantajları nedeniyle maksillofasiyal cerrahide farklı tipte greftlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden allojenik, ksenogreft ve alloplastik kemik greftleri de kullanılmaktadır. Allogreftler, otolog kemik greftlerine iyi bir alternatif olarak alveolar kemik cerrahisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu greftlerin osteoindüktif (84, 85) etkileri tartışmalıdır ve kaynakları sınırlıdır. Bağışıklık tepkisi oluşturmaması ve hastalık riski taşıması gibi dezavantajları vardır. Bu olumsuz etkilere rağmen günümüzde geliştirilen teknolojiler sayesinde bulaşıcı hastalıkların yayılma riski en aza indirilmektedir (61, 86).

Alloplastik greft materyali olan hidroksiapatit, iyi osteokondüktif özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Yüksek maliyet ve zor uygulama gibi

dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar, araştırmacıları greftler için çekilmiş dişleri kullanmayı düşünmeye yöneltmiştir. Dişler çekimden sonra atıldığından dolayı uygun maaliyetli bir greft alternatifi sağlamaktadır. Ayrıca, araştırmacılar rejenere dentin dokusunun greft olarak potansiyelini araştırmaktadır. Dentin de maliyetleri azaltılmış alternatif bir greftleme malzemesidir (87).

Ksenogreftler farklı türlerden elde edilen greftlerdir. Ksenogreftler, çeşitli yöntemlerle protein içeriği yok edilerek sadece inorganik komponenti bırakılan deproteinize sığır kemik materyalleridir (88). Ksenogreftler allogreftlerle karşılaştırıldığında bağ dokusu büyümesini engellediği ve gecikmiş vaskularizasyona karşın daha yavaş bir rezorbsiyon oranı gösterdiği söylenebilir (89).

Ksenojenik greftler greft materyalinde istenen özelliklerden olan yeni doku formasyonu, doku iyileşmesi ve hücresel adezyonun sağlanmasında osteokondüktif etki sağlamaktadır. Kimyasal ve fiziksel yapısı insan kansellöz kemiği ile benzer yapıda olmasından ötürü çeşitli araştırmacılar tarafından ksenogreftlerin yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda resorbe olabilen ya da rezorbe olmayan membranlar ile birlikte kullanımını önermişlerdir (90).

Tadjoedin ve arkadaşları (91), bir kemik grefti olarak deproteinize kansellöz sığır kemiği (DPBB, Bio-Oss) granüllerinin performansını ayrıntılı olarak incelemiştir. Ciddi atrofik maksilla rekonstrüksiyonu için DPBB ile tedavi edilen beş hasta üzerinde bir histomorfometri yapılmıştır. Sonuçlar, tüm durumlarda DPBB granüllerinin canlı yeni oluşmuş kemik köprüleri ile birbirine bağlı olduğunu göstermiştir. Aynı araştırmacılar greftlenen alandaki kemik hacminin, ve %37 ile %23 arasında değişmekte olduğunu saptamıştır. Veriler, tercihen otojen kemik partikülleri ile birleştirilmiş deproteinize kansellöz sığır kemiğinin, ciddi derecede atrofik insan maksillasında sinüs tabanının yükseltilmesi için uygun bir malzeme olduğunu göstermektedir. (91)

Hiçbir dezavantajı olmayan ideal ve yüksek kaliteli greft materyalini bulmak için çalışmalar devam etmektedir. Bizim çalışmamızda altın standardı olmayan fakat birçok olumlu özelliği taşıyan ksenogreft (Bio-Oss) kullanılmıştır. (91)

Kemik augmentasyonlarında kemik greftleri çeşitli materyallerle kombine edilerek rutin olarak kullanılmıştır. Klinik deneyler sonucunda; kemik grefti ile sitokinler gibi büyüme faktörlerini içeren trombosit zengin plazmanın (PRP)

kombinasyonunun kemik yoğunluğunu arttırmak için uygun olabileceği kanaatine varılmıştır. (79) Fennis ve arkadaşları (92), keçilerde mandibular rekonstrüksiyon yöntemini değerlendiren deneysel bir çalışma uygulamıştır. Bu çalışmada otojen iskeleler (scaffold) ile PRP kombinasyonu kullanılmıştır. Fennis ve arkadaşlarının çalışmasında, PRP kullanımının kemik iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. İn vitro çalışmalar, belirli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin kombinasyonunun osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını arttırdığını göstermiştir (92).

Wiltfang ve arkadaşları (93), trombosit-zengin plazmanın (PRP) kemik defektlerin rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için bir hayvan çalışması gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada bir domuzun alın bölgesindeki kritik boyuttaki defektler, otojen kemik, trikalsiyum-fosfat granülleri (CeraSorb), kansellöz sığır blokları (BioOss) ve kalan iki defekt PRP'li ve PRP'siz sığır kemiği indükleyici kolajen sünger kombinasyonları ile doldurulmuştur. Çalışmanın sonucuna göre PRP, ksenojenik kemik greftleri kullanıldığında ek fayda sağlamamıştır. Ancak otojen gruba PRP eklendiğinde kemik rejenerasyonu üzerinde önemli bir etki bulunmuştur (8).

Derong Zou ve arkadaşları (94), kemik iliği stromal hücreleri (BMSC'ler) ile birleştirilmiş kalsiyum fosfat siman (CPC) iskelelerinden oluşan doku mühendisliği yapılmış bir kemik kompleksi ile maksiller sinüs tabanının yükseltilmesinin ve eş zamanlı implantasyonunun etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada doku mühendisliği yöntemi kullanılarak, büyük bir keçi grubu kullanılmıştır. Dokuz keçinin on sekiz bilateral maksiller sinüsü rastgele üç gruba ayrılmıştır. Gruplar; CPC/BMSC kompleksi (n=6) grubu; tek başına CPC (n=6) grubu ve otojen kemik (n=6) grubudur. 3 aylık bir iyileşme döneminden sonra, sıralı üçlü renkli floresan etiketleme, mikro-CT ve ayrıca histolojik ve histomorfometrik analizler, doku mühendisliği yapılarak CPC/BMSC kompleksinin daha erken kemik oluşumu ve mineralizasyonunu destekleyebileceğini ve artırılmış maksiller sinüsün yüksekliği ve hacminin maksimum düzeyde korunabileceğini göstermiştir (94).

Katagiri ve arkadaşları (95), kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerden (MSC-CM) tetiklenmiş ortamda salgılanan büyüme faktörleri ve

sitokinlerin hücre davranışı üzerinde çeşitli etkileri olduğunu kanıtlamıştır. MSC-CM'nin hücre mobilizasyonunu, anjiyogenezi ve osteogenezi in vitro ve in vivo artırarak kemik rejenerasyonunu geliştirdiğini ortaya koymuştur (95).

Bizim çalışmamızda ksenogreftin, amniyotik sıvının ve plasentanın kemik iyileşmesi ve anjiyogeneze pozitif etkileri araştırılmıştır. Plasentanın en iç tabakası olan amniyotik membran, oldukça fazla miktarda elde edilebilen ve geniş miktarda kullanılabilen bir dokudur. İnsan amniyotik membranı (HAM), rejeneratif tıpta başlangıçta yara bakımı ve oftalmolojide kullanılan dikkat çekici bir malzeme olarak kabul edilmesine neden olan önemli avantajlı özelliklere sahiptir. İnce bir epiteli ve anjiyojenik büyüme faktörleri, sitokinler ve kollajen tip I ve IV, elastin, laminin ve fibronektin gibi diğer aktif maddeleri içeren vasküler olmayan bir stromaya sahiptir. Plasentadaki ana hücre popülasyonu olan insan amniyotik mezenkimal stromal hücresi (hAMSC), yüksek osteojenik farklılaşma potansiyeli gösterir (2).

Plasental amniyotik membranın terapötik uygulama için neredeyse sınırsız mevcudiyeti, kolay temini ve düşük işleme maliyetlerinin yanı sıra, bu dokunun bakteriyostatik, anti-inflamatuar, analjezik, yara iyileşmesi, reepitelizasyon, skar izi azaltımı ve anatomik bariyer oluşturma özellikleri dahil olmak üzere birçok faydalı özelliği literatürde bildirilmiştir (2, 96, 97).

İn anda oftalmoloji ve yara iyileşmesinde dondurularak kurutulmuş, sterilize edilmiş, hücreleştirilmiş, gliserol ile korunmuş ve kriyofrizasyon yöntemi ile korunmuş plasentadan elde edilmiş amniyotik membranlar kullanılmaktadır (98, 99, 100). Bu farklı işlem ve koruma yöntemlerinin sterilite, canlılık ve büyüme faktörü salınımını nasıl etkilediğine dair sorular devam etmektedir (101, 102). 10 kişinin sezeryan doğumlarından alınan plasentanın test sonrası hiçbirinde aerobik veya anaerobik bakteriler ile kontaminasyona rastlanmamıştır. Oysa normal doğumda test edilen doğal 10 plasentadan 4'ünde bakteri tespit edilmiştir. Bu nedenle plasentanın sezeryan doğumlarından alınan plasentalardan alınması tercih edilmesi gerekmektedir. Membranlar, gliserol (%50 gliserol) veya kriyoprezervasyon (%10 DMSO) sonrasında canlılık ve büyüme faktörü açısından da araştırılmıştır. Kriyoprezerve edilmiş membran, hücre canlılığını korumakta ve birkaç anjiyojenik büyüme faktörü ve sitokin salmaktadır (101, 102). Oysa 4°C'de gliserol içinde depolama, ani hücre ölümüyle

sonuçlanmaktadır (101). Bazı araştırmalar, ışınlama gibi farklı işleme yöntemlerinin amniyotik zarın büyüme faktörü içeriğini etkilediğini doğrulamıştır (103). Bizim çalışmamızda daha çok avantajlara sahip olan kriyoprezerve plasenta membranı kullanılmıştır. Kullanma aşaması sırasında oda sıcaklığına getirilerek tavşan kalvaryasında oluşturulan defektlere epitel ve granülasyon dokusunun defekt bölgesine göçünü engellemek için membran olarak kullanılmıştır. Ayrıca anjiyojenik büyüme faktörü ve sitokin salarak iyileşmeye olan pozitif etkisinden yararlanılarak çalışma prensipleri doğrultusunda uygulanmıştır.

İnsan amniotik sıvısı çeşitli büyüme faktörleri ve hyaluronik asit içermektedir. Tendon, sinir ve kemik yaralanmalarının iyileşmesi üzerine pozitif etkiye sahiptir. İnsan amniotik membranı da tendon ve sinir iyileşmesi üzerine etkili olmakla birlikte yanık ve kompleks yaralarda cilt iyileşmesi üzerine de pozitif etkiye sahiptir (104).

-Steril rahimll paradigması hala tartışılmaktadır. Son kanıtlar, yavruların ilk mikrobiyal karşılaşmasının, komplikasyonsuz gebeliklerde doğumdan önce olduğunu göstermektedir. Erken yaşta sağlıklı bir mikrobiyotanın oluşturulması, yaşamın ilerleyen dönemlerindeki hastalıkların yükünü azaltmak için çok önemli olabilir (105).

Rehbinder ve arkadaşları (2) çocuklarda atopik dermatit ve alerjilerin önlenmesinde, komplikasyonsuz gebeliklerde steril olarak toplanan amniyotik sıvıda mikrobiyota varlığını araştırmıştır. Anaerobik kültürleme metodu ile rüptüre amniyotik membran numunelerinin %50'sinde bakteri tespit edilirken, sağlam membranı olan numunelerin hiçbirinde bakteri üremesi görülmemiştir. Rüptüre amniyotik membran numunelerinin Sanger diziliminden, yaygın olarak vajinal floranın bir parçası olan ve/veya intrauterin enfeksiyonlarla ilişkili bakteri türleri tanımlanmıştır. Araştırmacılar, komplike olmayan gebeliklerde fetal gelişimin amniyotik sıvı mikrobiyotasının yokluğunda gerçekleştiği ve mikrobiyal kolonizasyonunun uterus kasılmaları ve amniyotik membran yırtılmasından sonra başladığı sonucuna varmıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız amniyotik sıvı amniyosentez yöntemiyle serolojik olarak negatif olan hamile kadından, hamileliğin 2.trimestre döneminde steril olarak alınıp kriyoprezerve edilmiştir. Soğuk zincir ile Amsbio firmasından temin edilmiştir. Kullanma aşaması sırasında oda sıcaklığına getirilerek tavşan kalvaryasında oluşturulan defektlere çalışma prensipleri doğrultusunda uygulanmıştır.

Çalışmamızın hipotezlerinden biri çeşitli büyüme faktörleri ve hyaluronik asit içeren amniyotik sıvının kemik iyileşmesine pozitif etkisini ortaya koymaktır. Diğer ise amniyotik plasental membranın kollajen membrana benzer bir etki gösterip göstermeyeceğini araştırmaktır.

Wessing ve arkadaşları (106), meta-analizinde, implant çalışmalarında diş hekimliğinde kollajen membranlar ve partikül greft materyalleri kullanılarak yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu için farklı yöntemleri değerlendirmiştir. Partikül greft materyalleri ve rezorbe olabilen kollajen membranlar ile yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, lateral alveolar kret ogmentasyonu için etkili bir tekniktir. İmmediat ve sonraki implant yerleştirme için implant sağkalım oranları benzer olduğundan, mümkün olduğunca immediat implant yerleştirilmesi önerilmektedir. Membran fiksasyonu ve dekortikasyon gibi ek teknikler, cerrahi uygulamalar için faydalı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (106).

Soldatos ve arkadaşları (107), aşamalı bir yaklaşımla veya imediat implant yerleştirme ile yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu prosedürlerine mevcut ve halihazırda kullanılan farklı membran türleri hakkındaki bilgileri özetlemiştir. Rezorbe olmayan membranların en yaygın komplikasyonu, ekspoz olmalarıdır. Dikey kemik ogmentasyon prosedürleri için en uygun membranlar rezorbe olamayan membranlardır. Kombine defektler için her iki tipde başarılı sonuçlar alınır (107).

Eksik kemik varlığı ve bıçak sırtı kret tipleri genellikle implant tedavi planını karmaşıklaştırır. Kemik rejenerasyonu dahil olmak üzere kemiği yenilemek için çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Membranların birincil rolü, epitelyal ve bağ dokusu hücrelerini yenilemek yara bölgesinden uzaklaştırmak ve pluripotent ve osteojenik hücrelerin göç etmekte serbest olduğu alanı yaratmak ve sürdürmektir. (107) Bizim çalışmamızda amniyotik plasental membranın aynı şekilde yumuşak doku ile defekt arasında bir bariyer görevi görüp göremeyeceği araştırılmıştır. Hem histolojik hem immünohistokimyasal sonuçlar plasental amniyotik membranın kemik iyileşmesinde etkin olduğunu göstermiştir.

Rezorbe olabilen membranlar, doğal veya sentetik olabilir. Kollajen membranlar en yaygın kullanılan tiptir. Periodontal bağ dokusuna benzer kollajen bileşimine sahiptirler. Mevcut diğer malzemeler insan, domuz ve sığır perikard

membranları, insan amniyonu ve koryon dokusu, dondurularak kurutulmuş hücresiz insan dermal matrisidir. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kullanılan emilmeyen membranlar arasında yoğun politetrafloroetilen (dPTFE), genişletilmiş-politetrafloroetilen (e-PTFE), titanyum mesh ve titanyum takviyeli politetrafloroetilen bulunmaktadır. (107)

Plasentanın en iç tabakası olan amniyotik zar, oldukça fazla miktarda ve geniş parçalar halinde elde edilebilir bir dokudur. Önemli avantajlı özelliklere sahip olan insan amniyotik membranı (HAM), rejeneratif tıpta başlangıçta yara bakımı ve oftalmolojide kullanılmıştır. İnce bir epiteli ve anjiyojenik büyüme faktörleri, sitokinler ve kolajen tip I ve IV, elastin, laminin ve fibronektin gibi diğer aktif maddeleri içeren vasküler olmayan bir stromaya sahiptir. Plasentadaki ana hücre popülasyonu olan insan amniotik endotelial hücresi (hAEC), yüksek osteojenik farklılaşma potansiyeli gösterir (108).

Gültekin ve arkadaşları (108) Yeni Zelanda beyaz tavşanında tibial diyafiz kemiği defektlerinde taze insan amniyotik membran (FHAM) kullanımının iyileşmeye etkisini değerlendirmiştir. Çalışmada 4 grup oluşturulmuştur: 1.grupta tibia üzerindeki periost çıkartılarak kemik üzerinde defekt oluşturularak FHAM periostu taklit edecek şekilde defekt bölgesine sütüre edilmiştir. 2.grupta tibia üzerindeki periost kaldırılarak ve oluşturulan defekt içerisine FHAM yerleştirilerek periost tekrardan suture edilmiştir. 3.grup negatif kontrol (NC) grubudur ve tibia üzerindeki periost çıkartılarak kemik defekti oluşturulmuştur. Defekt boş bırakılarak, periost olmadan sütüre edilmiştir. 4.grup olan pozitif kontrol (PC) grubunda ise oluşturulan kemik defekti üzerine kaldırılan periost tekrardan sütüre edilmiştir. Kemik rejenerasyonu, ameliyattan 4 ve 8 hafta sonra radyografik, bilgisayarlı tomografi (μ -CT) ve histolojik analizlerle değerlendirilmiştir. Radyografik ve μ -CT analizinde; pozitif kontrol grubu (PC) ve 1. grupta, negatif kontrol grubu (NC) ve 2. gruba kıyasla gelişmiş yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. Deney sonrası 4.haftada yapılan histolojik boyamalarda, 1. grupta kalan örgü kemikler ve kırık matrisi, PC grubunda ise medüller boşluğu olan olgunlaşmamış lameller kemik ve kemik iliği oluşumu gözlenmiştir. 2. grupta, deneyden sadece 8 hafta sonra biraz yeni kemik oluşumu tespit edilmiştir. NC grubunda ise her iki zaman noktasında da herhangi bir iyileşme belirtisi

gözlenmemiştir. Sonuçlar, FHAM'ın çıkarılan periosteuma implante edildiğinde kritik boyutlu defektlerde kemik rejenerasyonunu arttırdığını, ancak aditif etkisinin doğal periosteum ile aynı etkiye sahip olmadığını göstermektedir (108).

Gültekin ve arkadaşları tarafından yukarıda da belirtildiği gibi 2.grup için, deneyden sadece 8 hafta sonra biraz yeni kemik oluşumu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda tavşan kalvaryal kemik yapısının maksillaya benzer olması, uygun bir model olarak tercih edilmesine sebep olmuştur. Çalışmamızda da plasentadan elde edilen amniyotik membran grubunda erken kemik iyileşmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır, hatta değer olarak kontrol grubuyla eşit diğer gruplarla kıyasladığımızda en düşük değeri göstermektedir. Erken grupların hematoksilen-eozin boyamalarında rezidüel greft oranları karşılaştırıldığında erken plasental amniyotik membran grubunun rezidüel greft oranı diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksektir. Rezidüel greftin fazla olması kemikleşmenin az olduğunun göstergesidir. Erken dönemde kemikleşmenin az olması ksenogreft kullanımından kaynaklanmış olabilir. Ksenogreftlere göre daha fazla osteoindüktif özelliği olan otojen greft kullanılması daha fazla erken kemikleşmeyi sağlayabilir. Gültekin ve arkadaşlarının çalışmasındaki tibial defektlerde defektin çevre duvarları köşelidir ve tabanı kemik duvarla çevrelidir. Çalışmamızdaki defektin duvarlarının yuvarlak ve defekt tabanının duramaterle komşuluk göstermesi iyileşme farklılıklarına sebep olabilir.

Çalışmamızdaki geç kemik iyileşmesi değerlendirilmesindeki bağ doku oranlarına bakıldığında ise geç plasental amniyotik membran grubunun bağ doku oranları diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Yeni kemik oluşma oranı ise geç plasental amniyotik membran grubunda diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazladır. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamız plasental amniyotik membranın kemik oluşumuna etkisinin uzun dönemde daha iyi olduğu ve kemikleşmenin geç başladığı anlaşılmaktadır. Çalışmamızın tavşan kalvaryası yerine tabanında da kemik desteği bulunan insan çene kemiği defektlerinde gerçekleştirilmesi kemikleşmenin daha kısa sürebileceğine yol açabilirdi.

Ghanmi ve arkadaşları (109), 36 erkek Wistar ratın her iki tibiasını kullanarak 72 açık kırık modeli oluşturmuş ve çalışmayı 3 grupta planlamıştır. Grup-1 kontrol

grubu olarak alınmıştır. Grup-2'de, kırık bölgesinde seronegatif gebelerin ikinci trimesterde yapılan amniosentezlerinden alınan insan amniotik sıvısı damlatılmıştır. Grup-3'te ise seronegatif gebelerin sezaryanları sonrası alınan insan amniotik membranı kırık bölgesine sarılmıştır ve sonrasında üzerine insan amniotik sıvısı damlatılmıştır. Uygulamalar sonrası üçüncü ve altıncı haftalarda radyolojik kırık kaynama paternleri ve Modifiye Lane-Sandhu sınıflaması kullanılarak yapılan histopatolojik ölçümler değerlendirilmiştir. Üçüncü hafta sonunda, Grup-2 ve Grup-3'te Grup-1'e göre daha iyi histopatolojik sonuçlar elde edilmiştir. Altıncı haftada ise Grup-2'nin sonuçları Grup-1'den daha iyi bulunmuştur. Grup-3'ün de sonuçları Grup-1'den iyi olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Üçüncü ve altıncı haftalarda Grup-2'nin histopatolojik skorları Grup-3'ten anlamlı derecede daha iyi bulunmuştur ($p=0.021$, $p=0.019$). Mevcut sonuçlara göre insan amniotik sıvının kırık iyileşmesi üzerine pozitif etkisi olmakla birlikte insan amniotik membranının pozitif etkisi saptanamamıştır. Düşük immünitesi ve temin kolaylığı nedeni ile insan amniotik membranı da insan amniotik sıvı ile kombine bir şekilde kırık iyileşmesinde farklı uygulama teknikleri ile kullanılabilir. (109)

Bizim çalışmamızın grupları da Ghanmi ve arkadaşların yaptığı araştırmaya benzer fakat defektlere amniyotik sıvıyı, membranı, amniyotik sıvı ile kombine membranı; ksenogreftle karıştırdık. Onların çalışmalarındaki sonuçlara göre insan amniotik sıvısının kırık iyileşmesi üzerine pozitif etkisi olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise immünohistokimyasal boyamalarda alkalin fosfataz ve osteokalsin değerleri istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar göstermemiştir. Ghanmi ve arkadaşları insan amniotik membranının pozitif etkisi olmadığını saptamıştır. Bizim çalışmamızda ise hem histolojik incelemede hem immünohistokimyasal incelemede geç plasental amniyotik membran grubunun değerleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır.

Tuncel ve Özgenel (110) tavşan TME'lerinde HAM kullanarak yapılan interpozisyonel artroplastinin ankilozu önlemede gap artroplastisine göre daha üstün olduğunu raporlamışlardır. Yine Tuncel ve arkadaşları (111) tavşan TME'lerinde hem taze hem kriyoprezerv HAM kullanılarak yapılan interpozisyonel artroplastinin diskektomi sonrası ankilozu önlemede temporalis muscle-fascia graft (tMFG) kullanılarak yapılan operasyon ile aynı etkiye sahip olduğunu da saptamışlardır.

Etchebarne ve ark (112) Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda Amniyotik membranın ticari olarak elde edilen membranlara alternatif olduğunu iddia etmektedir.

Amniyotik plesantal membran, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu için ticari olarak temin edilebilen kullanılan membranlara umut verici bir alternatiftir. Ek olarak, uygun bir yapı iskelesi ile ilişkili olarak, kemik iyileşmesine uygulanan doku mühendisliği stratejileri için de ideal adaylar olabilir.

İnsan amniotik sıvısı çeşitli büyüme faktörleri ve hyaluronik asit içermektedir. Tendon, sinir ve kemik yaralanmalarının iyileşmesi üzerine pozitif etkiye sahiptir. İnsan amniotik membranı da tendon ve sinir iyileşmesi üzerine etkili olmakla birlikte yanık ve kompleks yaralarda deri iyileşmesi üzerine de pozitif etkiye sahiptir (113).

Özgenel ve ark., (113) amniyotik sıvının perikondral greftlerde yeni kırıldak oluşumunu hızlandırdığını göstermiş ve bunun amniyotik sıvının içeriğindeki zengin hyaluronik asit ve büyüme faktörlerinden kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Özgenel ve ark. (55) başka bir çalışmalarında ise, perikondral fleplerde kırıldak dokusunun oluşumunda amniyon sıvısının etkilerini incelemişler ve içerdiği büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matris prekürsörlerinden dolayı olumlu etkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir (55) Diğer yandan Karaçal ve ark. tavşanlardaki kemik defektlerinin birine amniyotik sıvı diğerine ise serum damlatmıştır (114).

Amniyotik sıvı grubunda 6. haftanın sonunda histopatolojik olarak kemikleşmenin daha iyi olduğunu belirtmiştir (114).

Karaçal ve arkadaşlarına (114), göre kemik iyileşmesi, plastik cerrahi alanında çalışan araştırmacılar ve klinisyenler için zorluklar oluşturmaya devam etmektedir. Osteojenik veya osteoindüktif kemik materyali uygulanmadan kritik boyuttaki kemik defektlerinde tam kemik rejenerasyonu elde edilememektedir. Hücre dışı matris bileşenlerinin kemik veya yara iyileşmesi sırasında iyileşmenin ilk adımlarında kondroitin sülfat olarak hyaluronik asidin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Karaçal ve arkadaşları (114), osteoindüktif aktivite, yüksek konsantrasyonlarda hyaluronik asit, gyaluronik asit, uyarıcı aktivatör ve diğer faktörler içeren insan amniyotik sıvısı, tavşan kalvarial defektlerine subperiosteal olarak uygulandığında kemik iyileşmesini hızlandırabileceğini düşünerek çalışma planlamıştır. 2 gruba ayrılan 12 haftalık 10 Yeni Zelanda beyaz tavşanında 20 kalvarial defekt oluşturulmuştur.

Grup 1 defektleri üzerine insan amniyotik sıvısı damlatılırken, kontralateral defektleri olan gruba, yani grup 2'ye aynı miktarda normal salin solüsyonu damlatılmıştır. Ameliyat sonrası üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı haftalarda bilgisayarlı tomografi ile defektler üzerinde oluşan kemiğin yoğunluğu ölçülmüştür. Bu sürenin ardından defektler histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. İnsan amniyotik sıvısı ile tedavi edilen grup 1'deki defektler, salin solüsyonu ile tedavi olan grup 2 defektlerine göre önemli ölçüde daha yüksek kemikleşme göstermiştir. Postoperatif 6. haftada histolojik inceleme, insan amniyotik sıvısı ile tedavi edilen defektlerin (grup 1) kontrol grubu defektlerine (grup 2) göre daha üstün ossifikasyona sahip olduğunu ortaya koymuştur.(114)

Bizim çalışmamıza göre erken gruplarının hematoksil-eozin boyamalarında rezidüel greft oranları karşılaştırıldığında; amniyotik sıvı grubu ve amniyotik plasental membran ile kombine amniyotik sıvı grubu en az rezidüel grefti olan gruplardır. Fakat bu durum istatistiksel olarak anlamsızdır. Bağ dokusu sonuçları incelendiğinde amniyotik sıvı grubu ile amniyotik plasenta membran ile kombine amniyotik sıvı grubu değer olarak yüksek ama istatistiksel olarak anlamsızdır. Erken kontrol grubunun bağ doku oranı ise diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazladır. Yeni kemik oluşma oranı ise en fazla erken amniyotik sıvı+plasenta grubunda, daha sonra erken amniyotik sıvı grubunda görülmektedir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Erken kontrol grubu ve erken plasental amniyotik membran grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda erken iyileşme grubunda Karaçal ve arkadaşların (114), yaptığı çalışmaya benzer sonuçlar alınmıştır. Amniyotik sıvı grubu ve plasental amniyotik membran ile kombine amniyotik sıvı grubunda az rezidüel greft, oldukça yüksek bağ dokusu değerleri ve istatistiksel olarak anlamlı kemik oluşumu gözlenmiştir. Fakat geç iyileşme grubunda sonuçlar tamamıyla değişiklik göstermektedir. Geç gruplarının hematoksil-eozin boyamalarında rezidüel greft oranları karşılaştırıldığında geç kontrol ve geç amniyotik sıvı+ plasental amniyotik membran gruplarının rezidüel greft oranları geç amniyotik sıvı ve geç plasental amniyotik membran gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksektir. Bağ doku oranlarına bakıldığında ise geç plasental amniyotik membran grubunun bağ doku oranları diğer gruplara göre anlamlı olarak

daha düşük bulunmuştur. Yeni kemik oluşma oranı ise amniyotik sıvı ve kombine grubunda oldukça düşük gözlenmiştir. Sonuçları incelediğimizde erken kemik iyileşmesinde amniyotik sıvı çok etkili fakat zaman geçtikçe fonksiyonu azalmaktadır.

Bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak Karaçal ve arkadaşlarına (114), göre kemik üzerindeki olumlu iyileştirici etkileri nedeniyle ve ayrıca derin dondurma yöntemiyle saklanabiliyor olması sebebiyle, insan amniyotik sıvısı kemik iyileşmesinin tedavisinde yararlı bir yardımcı gibi görünmektedir.

Berardinelli ve arkadaşları tarafından koyun amniyotik sıvı mezenkimal hücreleri (ovine AFMC) ile magnezyumla zenginleştirilmiş hidroksiapatit (MgHA)/kollajen bazlı iskeletin in vivo kemik rejenerasyon sürecini iyileştirip iyileştiremeyeceğini değerlendirmek için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. OAFMC iskeletin (Test Grubu) veya tek başına iskeletin (Ctr Grubu) uygulanmasından 45 ve 90 gün sonra doku rejenerasyon sürecini karşılaştırmak için sekiz yetişkin koyunda iki taraflı sinüs yükseltilmesi yapılmıştır. Doku yeniden modelleme süreci, iskeleye yüklenen oAFMC'nin proliferasyon indeksi (PI), toplam vasküler alan (VA) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyon seviyeleri hesaplanarak histolojik, immünohistokimyasal ve morfometrik analizler yoluyla analiz edilmiştir. Sonuçlar MgHA/kollajen bazlı iskele, yükseltilmiş sinüslerde 90 gün boyunca oAFMC'nin hayatta kalmasını koruyan yüksek biyouyumluluk göstermiştir. oAFMC'nin kullanımı kemik birikimini artırarak ve daha hızlı bir anjiyojenik reaksiyonu uyarmıştır. Böylece hücre ile tedavi edilen sinüslerde daha yüksek hücre PI'si kaydedilmiştir. Ameliyattan 45 gün sonra Test Grubunda önemli ölçüde daha yüksek bir VEGF (Test vs. Ctr Grubu; p00.0004) ve daha büyük bir total VA (p00.0006) değeri tespit edilmiştir. Test Grubu sinüslerinde PI 45 günde önemli ölçüde daha yüksek iken (p00.027) 90 günde önemli ölçüde düşük olmuştur (p00.0007). Ctr Grubunda kaydedilen PI artmaya devam ederek 90. günde önemli ölçüde daha yüksek bir PI ile sonuçlanmıştır. Berardinelli ve arkadaşları tarafından osteoindüktif etkinin, oAFMC'nin varlığı ile önemli ölçüde iyileştirilebilir olduğu sonucuna varılmıştır. Amniyotik sıvı mezenkimal hücrelerinin (AFMC), maksillofasiyal ameliyatlarında hücre bazlı tedavi geliştirmek için yeni, büyük ölçüde ve kolay erişilebilir bir mezenkimal kök hücre kaynağını temsil edebileceği aynı araştırmacılar tarafından savunulmuştur.

Bir biyomimetik ticari iskenelin osteoindüktif etkisinin, oAFMC'nin varlığıyla önemli ölçüde iyileştirileceği ispatlanmıştır (120).

Zhang ve arkadaşları, fibroblast büyüme faktörü 2'nin (FGF-2) kolajenöz lif oluşumu üzerindeki etkisini ve insan amniyotik mezenkimal kök hücrelerinin (hAMSC'ler) osteojenik farklılaşmasını ve FGF-2 tarafından indüklenmiş otolog trombosit zengin plazma (PRP) ile birlikte kombinlenmiş hAMSC'lerin in vivo olarak tendondan kemiğe iyileşmede etkisini araştırmayı amaçlamıştır. In vitro, hAMSC'lerin, 14 gün boyunca çeşitli FGF-2 konsantrasyonları (0, 10, 20 ve 40 ng/ml) ile indüklendiği gözlenmiştir. Ligamentöz ve osteojenik farklılaşmayı, kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR, Western blot, immüno Floresan ve pikrosirius kırmızı boyama ile tespit etmişlerdir. In vivo olarak, FGF-2 geni ile indüklenmiş otolog PRP ile kombine edilmiş hAMSC'ler, histolojik inceleme, biyomekanik analiz ve radyografik analiz ile kanıtlandığı üzere, tendondan kemiğe iyileşme üzerinde diğer gruplara göre daha iyi bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Zhang ve arkadaşlarının çalışması sonucunda otolog PRP ile kombine FGF-2 geni ile indüklenmiş hAMSC'ler, özellikle akut sporla ilgili tendon-bağ yaralanmaları için tendondan kemiğe iyileşme için iyi bir tedavi yöntemi olabilir. (115)

Aydın ve arkadaşları (121), insan amniyotik sıvısının posterolateral spinal füzyon üzerindeki etkisini sıçan modelinde araştırmıştır. Bu çalışmada yirmi sekiz erkek Sprague Dawley sıçanı çalışmaya dahil edilmiştir. Denekler kontrol grubu ve amniyotik sıvı grubu olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Tüm otograft gruplarına posterolateral spinal füzyon uygulanmasına rağmen amniyotik sıvı grubunda füzyon bölgesine 0,3 ml santrifüjlenmiş insan amniyotik sıvısı eklenmiştir. Daha sonra gruplar 7 rattan oluşan alt gruplara ayrılarak; 3. ve 6. haftalarda radyolojik ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Amniyotik sıvı grubunda 6. haftada kontrol grubuna göre radyografik füzyon anlamlı bulunmuştur. Histolojik olarak, füzyon kalitesi, kontrol grubuna kıyasla hem 3. hem de 6. haftalarda amniyotik sıvı grubunda daha belirgindir. Amniyotik sıvı, büyüme faktörleri ve hyaluronik asit içermektedir. Aydın ve arkadaşlarının çalışmasının sonucunda büyüme faktörleri ve hyaluronik asitin her ikisinin de posterolateral spinal füzyonu arttırdığı bulunmuştur.

Progenitör/kök hücrelerin ideal bir kaynağının olup olmadığı araştırması halen devam etse de, biyoaktif materyallerin kullanımıyla birleştirilmiş hücre bazlı bir tedavinin kemik rejenerasyonunu önemli ölçüde iyileştirebileceğine dair kanıtlar sağlanmıştır (Ratnayake et al. 2017)

Barboni ve arkadaşları (122) doğrudan hızlı prototipleme (rPT) tekniği ile ortaya çıkan bir progenitör hücre kaynağı olan amniyotik epitel hücrelerini (AEC) bir kalsiyum-fosfat sentetik kemik grefti ile birlikte koyun maksiller sinus yükseltmesi amacıyla kullanmıştır. Tek başına veya ekilmiş koyun AEC (oAEC) ile tasarlanmış iki sentetik kemik grefti bloğu (0.14 cm³), 6 koyunun maksiller sinüslerine bilateral olarak yerleştirilmiştir. Koyunlar daha sonra rastgele iki gruba ayrılarak implantasyondan 45 ve 90 gün sonra sakrifiye edilmiştir (p.i.). Sinüsün kemik doku rejenerasyonu, mikro-bilgisayarlı tomografi (mikro-CT), morfolojik, morfometrik ve biyokimyasal analizlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, blok greftin entegrasyonunun ve kemik birikiminin oAEC'den olumlu etkilendiğini göstermiştir. oAEC tarafından tasarlanmış yapı iskeleleri ile greftlenen koyunlardan elde edilen sinüs örnekleri, azaltılmış bir fibrotik reaksiyon, sınırlı bir inflamatuvar yanıt ve hızlandırılmış bir anjiyogenez süreci sergilemiştir. Ek olarak, Barboni ve arkadaşları (122) oAEC'nin varlığının, ya kemik birikimini artırarak ya da kemik çekirdeklenme odaklarını daha fazla genişleterek osteogenezi önemli ölçüde uyardığı sonucuna varmıştır. oAEC; anjiyogenez, vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonu ve inflamasyonda doku rejenerasyonunu başarılı bir şekilde yönlendirmiştir. Oynadığı modülatör rolün yanı sıra, yeni biriken osteoid matriks içinde oAEC'nin mevcudiyeti ve konakçı dokulara nakledildiğinde belirli bir kemikle ilgili osteokalsin, OCN proteinin ekspresyonu yetenekleri olduğunu Barboni ve arkadaşları (122) ispatlamıştır.

Bu çalışmaya benzer bizim çalışmamızda da birinci ay ve üçüncü ay tavşanlar sakrifiye edilmiştir. İmmünohistolojik olarak örnekler incelendiğinde erken deney grubunda ALP ve OCT ekspresyonu açısından istatistiksel olarak amniyotik sıvı ve plasentadan elde edilmiş amniyotik membranın kombine kullanıldığı grupta anlamlı bir fark bulunmuştur. Fakat geç deney gruplarının immünohistokimyasal boyamalarında geç amniyotik plasental membran grubunun diğer gruplara kıyasla ALP düzeyinin daha fazla olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Geç grupların OCT düzeyine

bakıldığında ise plasental amniyotik membran grubunun diğer gruplara göre OCT düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Ragazzo ve arkadaşları (116) maxillofasiyal cerrahide medikal ilaçlara bağlı olan çene osteonekrozundan (MRONJ) etkilenen hastalarda yara iyileşmesinde HAM kullanımı ile elde edilen sonuçları kendi çalışmalarında rapor etmişlerdir. Hastalar rastgele 2 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba rezektif cerrahi uygulandıktan sonra HAM yerleştirilmiştir (Grup A), ikinci grup ise sadece rezektif cerrahi (Grup B) uygulanmıştır. Veriler ameliyattan 3, 6, 12 ve 24. aylarda değerlendirilmiştir. Grup A ve B ($p = 0.23$) arasında relaps açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır. Ancak Fisher testi istirahatte ağrıda HAM kullanımı ile sadece cerrahi tedavi arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p=0,032$). Ragazzo ve arkadaşları; uzun vadeli komplikasyonlar ve fonksiyonlar açısından amniyotik membran kullanımının hastanın yaşam kalitesini arttırdığı ve ağrı algısını azalttığı sonucuna varmıştır (116).

Chopra ve arkadaşları (117), diş çekimi sonrası dental implant rehabilitasyonu için çekim soketlerinde insan koryonik amniyotik membranını ve trombosit zengin fibrini, yeni kemik oluşumu ve yumuşak doku iyileşmesi açısından değerlendirmiştir. Prospektif, üçlü kör klinik çalışmaya her biri aynı arka iki çekim yeri olan, sağlam bukkal kemik ve çekim soketinin çevresinde yumuşak doku bulunan ve dental implantlarla rehabilitasyon endikasyonu olan hastalar dahil edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası, insan koryonik amniyotik membran bir çekim soketine, trombosit zengin fibrin ise diğer çekim soketine yerleştirilmiştir. 3 ay sonra, ilgili bölgelerdeki yumuşak ve sert dokulardan örnek almak amacıyla bir trefan frez kullanılmıştır. Histolojik olarak; yeni kemik oluşumunun yüzdesi ve lenfosit yoğunluğu değerlendirilmiştir. 80 hasta çalışmaya dahil edilmiş ve sekiz hasta çalışma dışı bırakılmıştır. İnsan koryonik amniyotik membran grubunda yeni kemik oluşumunun ortalama yüzdesi 45.71 ± 4.0 ve PRP grubu için 41.39 ± 6.29 olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. İnsan koryonik amniyotik membran grubunda, sekiz bölgeden altısı hafif lenfosit yoğunluğuna sahipken, PRP grubu eşit sayıda hafif ve orta düzeyde lenfosit yoğunluğuna sahiptir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmanın sınırlamaları dahilinde sonuçlar, insan koryonik amniyotik

membranının, çekim yuvasında yeni kemik oluşumu ve yumuşak doku iyileşmesini sağlamada PRP ile kıyaslandığında, etkinliğinde bir fark olmadığını göstermiştir (117).

Bizim çalışmamızda amniyotik membran tavşan kalvaryal defektlerinin içine koyulmamıştır, membran olarak kullanılmıştır. Geç deney gruplarının immünohistokimyasal incelemelerine göre; plasental amniyotik membranı tavşan kalvaryal defektlerine membran olarak kullanmak sonuçlarımızı olumlu yönde etkilemiştir.

Aghlaghi ve arkadaşları (118), iyileştirici, osteojenik ve hücre tedavisi potansiyeline sahip biyolojik bir zar olarak insan amniyotik zarlarının (HAM'ler), kemik defektleri üzerine etkilerinin sonuçlarını araştırmıştır. Bu çalışma, maksillomandibular kemik defektlerine onlay kemik greftleri için osteojenik bir membran olarak bukkal yağ yastığından türetilen kök hücrelerin (BFSC'ler) HAM'e kültüre edilerek potansiyelini klinik olarak değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bu çalışmaya çene kemiği defekti olan dokuz hasta alınmıştır. Hastalar iki çalışma grubuna ayrılmıştır: HAM kaplamalı iliak krest kemik grefti (n = 5) ve BFSC yüklü HAM kaplı iliak kemik grefti (n = 4). Greftlemeden beş ay sonra ve implant yerleştirmeden önce radyomorfometrik analiz için konik ışınli bilgisayarlı tomografi alınmıştır. Kemik genişliğindeki ortalama artışın HAM + BFSC'ler grubunda anlamlı olarak daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca, dikey boyuttaki değişiklikler HAM + BFSCs grubunda daha fazladır. Böylece bu çalışmaya dayanarak HAM'ın mezenkimal kök hücrelerle birlikte kullanımı, özellikle horizontal boyutta kemik rejenerasyonunu artırabilir yorumu yapılabilir. Ayrıca, bu yöntemin kullanılması alınması gereken otojen kemik greft miktarını ve sekonder kemik rezorpsiyonunu azaltmıştır. (118)

Dziedzic ve arkadaşlarının çalışmasında kemik depozisyonunu stimüle eden yağ dokusu kaynaklı stromal hücre (Adipose-derived stromal cells (ASCs)) ile desteklenmiş hüresizleştirilmiş amniyotik membran (Decellularized Human Amniotic Membrane (DAM)) kontrole kıyasla daha yüksek kemik hacmi ve trabeküler kemik sayısı göstermiştir. In vivo DAM tedavisi, kemik doku depozisyonu, kemik ağını, neovaskülarizasyonu ve endojen hücre migrasyonu için kollajen yapısal matriksi sağlayan osteokondüksiyon sağlamıştır (123).

Lopez-Martez ve arkadaşları (119) yüksek kondiler artroplasti ve diskektomiye takiben HAM'ın yerleştirildiği TME'nin inflamatuvar olmayan dejeneratif osteoartriti ile başvuran 32 yaşındaki bir kadının olağan dışı bir vakasının klinik ve radyolojik sonuçlarını rapor etmiştir. Prosedür, ağrının kesilmesi üzerine olumlu ve çene hareketlerinde önemli bir iyileşme ile sonuçlanmıştır. Uzun süreli takip bilgisayarlı tomografisinde, yeni ektopik kemik oluşumuyla birlikte glenoid fossanın tamamen yeniden şekillendiği gözlenmiştir. Diskektomi ve artroplasti yapılırken HAM uygulaması ankilozu önlemek için alternatif bir prosedür olsa da, bu klinik rapor, bu bölgede ektopik kemik oluşumunu indüklemeye olasılığını vurgulamaktadır (119).

Öner ve arkadaşları farklı greft materyallerini amniyotik sıvı ile birlikte uyguladıkları ratlarda amniyotik sıvının 8 hafta sonunda radyolojik ve histolojik olarak posterior spinal füzyonda özellikle allogreftler ile kombine olduğunda arttırıcı etkiye sahip olduğu sonucuna varmıştır (124).

Literatüre dayanarak amniyotik sıvı ve plasentanın kemik ve kıkırdak iyileşmesinde etkili olduğunu destekleyen yayınlar bulunmaktadır. Erişebildiğimiz birçok çalışmada amniyotik sıvı ilgili bölgeye enjekte edilerek kullanılmıştır. Plasental amniyotik membranın kullanımı ise lokal olarak uygulama şeklindedir. Bizim çalışmamızda greftin kemik oluşumuna pozitif etkileri ve amniyotik sıvının ve membranın kemik ve kıkırdak iyileşmesi ve anjiogenezise pozitif etkilerinin bir araya getirilmesi planlanılarak daha etkili sonuç alacağımız düşünülmüştür. Amniyotik sıvının grefte karıştırılarak kemik defektlerine uygulanması ve amniyotik plasental membranın membran olarak kullanılması kemik iyileşmesine etkisi ilk kez bizim çalışmamızda araştırılmıştır. Bizim çalışmamızın amacı klinik şartlarda kullanım imkanı sağlayan, kolay ve yeni bir yöntem geliştirme olasılığını araştırmaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda amniyotik sıvıyı ve amniyotik plasental membranı klinik uygulamamızda rutin kullandığımız ksenogreft ile karşılaştırarak kemik iyileşmesi üzerine etkilerini inceledik.

Çalışmamız hayvan çalışması olup tavşan kalvaryası kullanılmıştır. Tavşan kalvaryasının intramembranöz kemikleşme ile oluşması bizim çalışma alanımız olan alveoler kemik ile yapısal benzerliği nedeniyle tercih edilmiştir.

Histopatolojik incelemeler sonucunda kısa dönem örneklerde erken gruplar arasında kemikleşme oranı en iyi olan grubun erken amniyotik sıvı + amniyotik plasental membran grubu olduğu görülmüştür. Geç dönem örneklerine göre kemikleşmenin en iyi gerçekleştiği grup geç amniyotik plasental membran grubudur. Bu sonuçlara dayanarak amniyotik plasental membranın ve amniyotik sıvının klinik uygulamalarda da yer bulabileceği makul gelmektedir.

Yapılan daha önceki çalışmalarda amniyotik sıvı ve amniyotik plasenta membranının kemik morfogenetik proteinlerini ve büyüme faktörlerini olumlu etkilediği rapor edilmiştir. Yaptığımız immunohistokimyasal incelemede, erken dönemde amniyotik sıvı + amniyotik plasental membranın alkalen fosfataz ve osteocalcin ekspresyonunun yüksek gözlenmesi kemik oluşumunu desteklediğini göstermiştir.

Geç gruplarının immunohistokimyasal boyamalarında geç amniyotik plasental membran grubunun diğer gruplara kıyasla ALP ve OCT düzeyinin daha fazla olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Amniyotik plasental membranın yüksek maliyet, alerjik reaksiyon, gibi geleneksel membran dezavantajlarını ortadan kaldırabilecek olan alternatif bir membran materyali olduğu görülmüştür. Çalışmamızda amniyotik plasental membranı ve amniyotik sıvıyı klinik pratiğimizde nasıl kullanabileceğimizi görmeyi amaçladık.

Histolojik ve immünohistokimyasal sonuçlar bize bu materyallerin kemik oluşumunu desteklediğini gösterdi. Plasentanın ve amniyotik sıvının büyük miktardaki pigmentasyonlardaki başarısını belirlemek için daha fazla insan ve hayvan çalışması yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Klüppel, Leandro Eduardo, Fernando Antonini, Sérgio Olate, Frederico Felipe Nascimento, José Ricardo Albergaria-Barbosa, and Renato Mazzonetto. Bone Repair Is Influenced by Different Particle Sizes of Anorganic Bovine Bone Matrix. *Journal of Craniofacial Surgery* 2013;24(4):1074–77. doi: 10.1097/SCS.0b013e318286a0a3.
2. Parolini, Ornella, Francesco Alviano, Gian Paolo Bagnara, Grozdana Bilic, Hans-Jörg Bühring, et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008b;26(2):300–311. doi: 10.1634/stemcells.2007-0594.
3. Kolk, Andreas, Jörg Handschel, Wolf Drescher, Daniel Rothamel, Frank Kloss, et al. Current Trends and Future Perspectives of Bone Substitute Materials – From Space Holders to Innovative Biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012a;40(8):706–18. doi: 10.1016/j.jems.2012.01.002.
4. Dallas, Sarah L., Matthew Prideaux, and Lynda F. Bonewald. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocrine Reviews*. 2013;34(5):658–90. doi: 10.1210/er.2012-1026.
5. Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker. Bone Biology. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1995;77(8):1256–75. doi: 10.2106/00004623-199508000-00019.
6. Robling, Alexander G., Alesha B. Castillo, and Charles H. Turner. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2006;8(1):455–98. doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721.
7. Clarke, Bart. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3(Supplement 3). 2008a;S131–39. doi: 10.2215/CJN.04151206.
8. Everts, V., J. M. Delaissé, W. Korper, D. C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, and W. Beertsen. The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's

- Lacunae and Initiating Bone Formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17(1):77–90. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.1.77.
9. Frost, Harold M. Tetracycline-Based Histological Analysis of Bone Remodeling. *Calcified Tissue Research*. 1969;3(1):211–37. doi: 10.1007/BF02058664.
 10. Ratnayake, Jithendra T. B., Michael Mucalo, and George J. Dias. Substituted Hydroxyapatites for Bone Regeneration: A Review of Current Trends. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017;105(5):1285–99. doi: 10.1002/jbm.b.33651.
 11. Raisz. L. G., Rodan. G. A., Avioli. L. V., and Krane. S. M. Embryology and Cellular Biology of Bone, in *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*,. Eds., Academic Press, New York, NY, USA .1998;3:1–22.
 12. Fukumoto, Seiji, and T. John Martin. Bone as an Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009;20(5):230–36. doi: 10.1016/j.tem.2009.02.001.
 13. Marks, Sandy C., and Steven N. Popoff. Bone Cell Biology: The Regulation of Development, Structure, and Function in the Skeleton. *American Journal of Anatomy*. 1988;183(1):1–44. doi: 10.1002/aja.1001830102.
 14. Ducky, Patricia, Thorsten Schinke, and Gerard Karsenty. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*. 2000;289(5484):1501–4. doi: 10.1126/science.289.5484.1501.
 15. Kolk, Andreas, Jörg Handschel, Wolf Drescher, Daniel Rothamel, Frank Kloss, et al. Current Trends and Future Perspectives of Bone Substitute Materials – From Space Holders to Innovative Biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012b;40(8):706–18. doi: 10.1016/j.jcms.2012.01.002.
 16. Gartner L.P, and Hiatt J. L. *Color Atlas and Text of Histology*. Lippincott Williams &Wilkins. 2014;6:81-107.
 17. Dimitriou, Rozalia, Eleftherios Tsiridis, and Peter v. Giannoudis. Current Concepts of Molecular Aspects of Bone Healing. *Injury*. 2005;36(12):1392–1404. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.019.

18. Buckley, Christopher D., Derek W. Gilroy, Charles N. Serhan, Brigitta Stockinger, and Paul P. Tak. The Resolution of Inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(1):59–66. doi: 10.1038/nri3362.
19. Moore, W. R. ., G. I. Bain, and S. E. Graves. Synthetic Bone Graft Substitutes. *ANZ Journal of Surgery*. 2001;71(6):354–61.
20. Holtrop M.E., and N. J. Caldwell. Light and Electron Microscopic Structure of Bone- Forming Cells. In: Hall BK, Ed. *The Osteoblast and Osteocyte*. Telford Press Inc. 1990;13:1–39.
21. Feehan, Karen T., and Derek W. Gilroy. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends in Molecular Medicine*. 2019;25(3):198–214. doi: 10.1016/j.molmed.2019.01.006.
22. Lin, Tzu-hua, Yasunobu Tamaki, Jukka Pajarinen, Heather A. Waters, Deanna K. Woo, et al. Chronic Inflammation in Biomaterial-Induced Periprosthetic Osteolysis: NF-KB as a Therapeutic Target. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(1):1–10. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.034.
23. Cho, Tae-Joon, Louis C. Gerstenfeld, and Thomas A. Einhorn. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor β Superfamily During Murine Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002;17(3):513–20. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513.
24. Claes, Lutz, Stefan Recknagel, and Anita Ignatius. Fracture Healing under Healthy and Inflammatory Conditions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;8(3):133–43. doi: 10.1038/nrrheum.2012.1.
25. Pahwa, R. ., A. ., Goyal, and I. Jialal. Chronic Inflammation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022.
26. Loi, Florence, Luis A. Córdova, Jukka Pajarinen, Tzu-hua Lin, Zhenyu Yao, et al. Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone*. 2016;86:119–30. doi: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
27. Pajarinen, Jukka, Tzuhua Lin, Emmanuel Gibon, Yusuke Kohno, Masahiro Maruyama, et al. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Bone Healing. *Biomaterials*. 2019;196:80–89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025.

28. Fullerton, James N., and Derek W. Gilroy. Resolution of Inflammation: A New Therapeutic Frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(8):551–67. doi: 10.1038/nrd.2016.39.
29. Kao, Solon T., and Daniel D. Scott. A Review of Bone Substitutes. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 2007;19(4):513–21. doi: 10.1016/j.coms.2007.06.002.
30. Mosser, David M., and Justin P. Edwards. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958–69. doi: 10.1038/nri2448.
31. Hak, David J., Daniel Fitzpatrick, Julius A. Bishop, J. Lawrence Marsh, Susanne Tilp, et al. Delayed Union and Nonunions: Epidemiology, Clinical Issues, and Financial Aspects. *Injury*. 2014;45:3–7. doi: 10.1016/j.injury.2014.04.002.
32. Clarke, Bart. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3(Supplement 3). 2008b;S131–39. doi: 10.2215/CJN.04151206.
33. Develioğlu H. Kritik Boyutlu ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler.: Cumhuriyet; 2003.
34. Bhatt, Reena A., and Tamara D. Rozental. Bone Graft Substitutes. *Hand Clinics*. 2012;28(4):457–68. doi: 10.1016/j.hcl.2012.08.001.
35. Misch, Craig M. Use of the Mandibular Ramus as a Donor Site for Onlay Bone Grafting. *Journal of Oral Implantology*. 2000;26(1):42–49. doi: 10.1563/1548-1336(2000)026<0042:UOTMRA>2.3.CO;2.
36. Paff George Hugo. *Anatomy of the Head and Neck*. Vol. 1. 1st ed. Philadelphia; 1973. Publisher Saunders.
37. Suneelkumar, Chinni, Krithika Datta, ManaliR Srinivasan, and SampathT Kumar. Biphasic Calcium Phosphate in Periapical Surgery. *Journal of Conservative Dentistry*. 2008;11(2):92. doi: 10.4103/0972-0707.44059.
38. Bosch, Carles, Birte Melsen, and Karin Vargervik. Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials. *Journal of*

- Craniofacial Surgery. 1998a;9(4):310–16. doi: 10.1097/00001665-199807000-00004.
39. Craft, P. D. ,, and L. A. Sargent. Membranous Bone Healing and Techniques in Calvarial Bone Grafting. *Clinics in Plastic Surgery*,. 1989;16:11-19.
40. Fennis, Jeroen P. M., Paul J. W. Stoeltinga, Matthias A. W. Merckx, and John A. Jansen. Reconstruction of the Mandible with a Poly(D,L-Lactide) Scaffold, Autogenous Corticocancellous Bone Graft, and Autogenous Platelet-Rich Plasma: An Animal Experiment. *Tissue Engineering*. 2005;11(7–8):1045–53. doi: 10.1089/ten.2005.11.1045.
41. Hao, Yanxia, David Hui-Kang Ma, David G. Hwang, Wan-Soo Kim, and Fen Zhang. Identification of Antiangiogenic and Antiinflammatory Proteins in Human Amniotic Membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348–52. doi: 10.1097/00003226-200005000-00018.
42. Haugen, Håvard Jostein, Ståle Petter Lyngstadaas, Filippo Rossi, and Giuseppe Perale. Bone Grafts: Which Is the Ideal Biomaterial?. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019;46:92–102. doi: 10.1111/jcpe.13058.
43. Horowitz, R. A. ,, M. D. ., Leventis, M. D. ., Rohrer, and H. S. Prasad. Bone Grafting: History, Rationale, and Selection of Materials and Techniques. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* . 2014;35:4.
44. Dewi, Anne Handrini, and Ika Dewi Ana. The Use of Hydroxyapatite Bone Substitute Grafting for Alveolar Ridge Preservation, Sinus Augmentation, and Periodontal Bone Defect: A Systematic Review. *Heliyon*. 2018;4(10):e00884. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00884.
45. Kima, Su-Gwan, Hwan-Ho Yea, and Young-Kyun Kimb. Grafting of Large Defects of the Jaws with a Particulate Dentin–Plaster of Paris Combination. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1999;88(1):22–25. doi: 10.1016/S1079-2104(99)70188-5.
46. Cypher, Thomas J., and Jordan P. Grossman. Biological Principles of Bone Graft Healing. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 1996;35(5):413–17. doi: 10.1016/S1067-2516(96)80061-5.

47. Elsalanty, Mohammed E., and David G. Genecov. Bone Grafts in Craniofacial Surgery. *Craniofacial Trauma & Reconstruction*. 2009;2(3–4):125–34. doi: 10.1055/s-0029-1215875.
48. Fernandez de Grado, Gabriel, Laetitia Keller, Ysia Idoux-Gillet, Quentin Wagner, Anne-Marie Musset, Nadia Benkirane-Jessel, et al. Bone Substitutes: A Review of Their Characteristics, Clinical Use, and Perspectives for Large Bone Defects Management. *Journal of Tissue Engineering*. 2018;9:204173141877681. doi: 10.1177/2041731418776819.
49. Kattimani, Vivekanand Sabanna, Sudheer Kondaka, and Krishna Prasad Lingamaneni. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*. 2016;7:BTRL.S36138. doi: 10.4137/BTRL.S36138.
50. Sanan, Abhay, and Stephen J. Haines. Repairing Holes in the Head: A History of Cranioplasty. *Neurosurgery*. 1997;40(3):588–603. doi: 10.1097/00006123-199703000-00033.
51. Pommer, B. ., W. ., Zechner, G. ., Watzek, and G. W. A. R. Palmer. To Graft or Not to Graft? Evidence-Based Guide to Decision Making in Oral Bone Graft Surgery. *Bone Grafting*. 2012;1-25.
52. Roberts, Timothy T., and Andrew J. Rosenbaum. Bone Grafts, Bone Substitutes and Orthobiologics. *Organogenesis*. 2012;8(4):114–24. doi: 10.4161/org.23306.
53. Smith, Jodi L., Katherine M. Gesteland, and Gary C. Schoenwolf. Prospective Fate Map of the Mouse Primitive Streak at 7.5 Days of Gestation. *Developmental Dynamics*. 1994;201(3):279–89. doi: 10.1002/aja.1002010310.
54. Bostrom, Mathias P. G., and Daniel A. Seigerman. The Clinical Use of Allografts, Demineralized Bone Matrices, Synthetic Bone Graft Substitutes and Osteoinductive Growth Factors: A Survey Study. *HSS Journal*. 2005;1(1):9–18. doi: 10.1007/s11420-005-0111-5.
55. Wang, K. C. ., and S. S. Yang. Clinical Application of Unigraft in the Treatment of Human Periodontal Defects. . Available Online. 2005. doi: <https://www.unicarebiomedical.com/Pdf/UnigraftClinicalStudy.Pdf> .

56. Kozusko, Steven D., Charles Riccio, Micheline Goulart, Joel Bumgardner, Xi Lin Jing, et al. Chitosan as a Bone Scaffold Biomaterial. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2018;29(7): 1788–93. doi: 10.1097/SCS.0000000000004909.
57. Pignaton, Túlio Bonna, Ann Wenzel, Carlos Eduardo de Almeida Ferreira, Carolina Borges Martinelli, Guilherme J. P. L. Oliveira, Elcio Marcantonio, and Rubens Spin- Neto. Influence of Residual Bone Height and Sinus Width on the Outcome of Maxillary Sinus Bone Augmentation Using Anorganic Bovine Bone. *Clinical Oral Implants Research*. 2019;30(4):315–23. doi: 10.1111/clr.13417.
58. Scarano, Antonio, Marco Degidi, Giovanna Iezzi, Gabriele Pecora, Maurizio Piattelli, et al. Maxillary Sinus Augmentation With Different Biomaterials: A Comparative Histologic and Histomorphometric Study in Man. *Implant Dentistry*. 2006;15(2):197–207. doi: 10.1097/01.id.0000220120.54308.f3.
59. Özkan, YaŞar, Burçin Akoğlu, and Yasemin Kulak-Özkan. Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Bovine Bone Grafts With Simultaneous Implant Placement: A 5-Year Prospective Follow-Up Study. *Implant Dentistry*. 2011;20(6):455–59. doi: 10.1097/ID.0b013e3182386cbc.
60. Uzbek, Usman Haider. Bone Forming Potential of An-Organic Bovine Bone Graft: A Cone Beam CT Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*: 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/8557.5352.
61. Stavropoulos, Andreas, Péter Windisch, Dora Szendrői- Kiss, Rosta Peter, István Gera, et al. Clinical and Histologic Evaluation of Granular Beta-Tricalcium Phosphate for the Treatment of Human Intrabony Periodontal Defects: A Report on Five Cases. *Journal of Periodontology*. 2010;81(2):325–34. doi: 10.1902/jop.2009.090386.
62. Nakajima, Y. ., J. P. ., Fiorellini, D. M. ., Kim, and H. P. Weber. Regeneration of Standardized Mandibular Bone Defects Using Expanded Polytetrafluoroethylene Membrane and Various Bone Fillers. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*.. 2007;27(2):151–59.
63. Esfahanizadeh, N. ., M. R. ., Nourani, A. ., Bahador, N. ., Akhondi, and M. Montazeri. The Anti-Biofilm Activity of Nanometric Zinc Doped Bioactive

- Glass against Putative Periodontal Pathogens: An in Vitro Study. *Biomed. Glas.* 2018;4:95–107.
64. Lovelace, Teri Brooks, James T. Mellonig, Roland M. Meffert, Archie A. Jones, Pirkka v. Nummikoski, et al. Clinical Evaluation of Bioactive Glass in the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *Journal of Periodontology.* 1998;69(9):1027–35. doi: 10.1902/jop.1998.69.9.1027.
 65. Krishnan, Vidya, and T. Lakshmi. Bioglass: A Novel Biocompatible Innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* 2013;4(2):78. doi: 10.4103/2231-4040.111523.
 66. Skallevoid, Hans Erling, Dinesh Rokaya, Zohaib Khurshid, and Muhammad Sohail Zafar. Bioactive Glass Applications in Dentistry. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(23):5960. doi: 10.3390/ijms20235960.
 67. Ezzat, AbdelrahmanE. M., and HannaM El-Shenawy. Repair of Cleft Alveolar Bone with Bioactive Glass Material Using Z-Plasty Flap. *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* 2015;5(3):211. doi: 10.4103/2229-516X.165381.
 68. Hench L. L., June W. Hench, and Greenspan D. C. Bioglass: A Short History and Bibliography, *Journal of the Australian Ceramic Society.* 2004;40:1–41.
 69. Xie, Yu, Songhang Li, Tianxu Zhang, Chao Wang, and Xiaoxiao Cai. Titanium Mesh for Bone Augmentation in Oral Implantology: Current Application and Progress. *International Journal of Oral Science.* 2020;12(1): 37. doi: 10.1038/s41368-020-00107-z.
 70. Kutkut, Ahmad, and Sebastiano Andreana. Medical-Grade Calcium Sulfate Hemihydrate in Clinical Implant Dentistry: A Review. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 2010;20(4):295–301. doi: 10.1615/ Jlong Term Eff Med Implants.v20.i4.40.
 71. Maragos, P. ., N. F. ., Bissada, R. ., Wang, and B. P. Cole. Comparison of Three Methods Using Calcium Sulfate as a Graft/Barrier Material for the Treatment of Class II Mandibular Molar Furcation Defects. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry.* 2002;22(5):493-501.

72. Galende, Elisa, Ioannis Karakikes, Lisa Edelmann, Robert J. Desnick, Thomas Kerenyi, et al. Amniotic Fluid Cells Are More Efficiently Reprogrammed to Pluripotency Than Adult Cells. *Cellular Reprogramming*. 2010;12(2):117–25. doi: 10.1089/cell.2009.0077.
73. Delo, Dawn M., Paolo de Coppi, Georg Bartsch, and Anthony Atala. Amniotic Fluid and Placental Stem Cells: 2006. Pp. 426–38 in.
74. Snow, M. H. ,, and D. Bennett. Gastrulation in the Mouse: Assessment of Cell Populations in the Epiblast of Tw18/Tw18 Embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.. 1978;47:39–52.
75. Downs, Karen M., Elissa R. Hellman, Jacalyn McHugh, Kathryn Barrickman, and Kimberly E. Inman. Investigation into a Role for the Primitive Streak in Development of the Murine Allantois. *Development* 2004;131(1):37–55. doi: 10.1242/dev.00906.
76. Downs, K. M., and C. Harmann. Developmental Potency of the Murine Allantois. *Development*. 1997;124(14):2769–80. doi: 10.1242/dev.124.14.2769.
77. Robinson, Wendy P., Deborah E. McFadden, Irene J. Barrett, Brian Kuchinka, Maria S. Peñaherrera, et al. Origin of Amnion and Implications for Evaluation of the Fetal Genotype in Cases of Mosaicism. *Prenatal Diagnosis*. 2002;22(12):1076–85. doi: 10.1002/pd.483.
78. Bartha, J. Alpha-Fetoprotein and Hematopoietic Growth Factors in Amniotic Fluid. *Obstetrics & Gynecology*. 2000;96 (4): 588–92. doi: 10.1016/S0029-7844 (00) 00975-3.
79. Parolini, Ornella, Francesco Alviano, Gian Paolo Bagnara, Grozdana Bilic, Hans-Jörg Bühring, et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008a;26(2):300–311. doi: 10.1634/stemcells.2007-0594.
80. Tsai, M. S. Isolation of Human Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Second-Trimester Amniotic Fluid Using a Novel Two-Stage Culture Protocol. *Human Reproduction*. 2004;19(6):1450–56. doi: 10.1093/humrep/deh279.

81. Bosch, Carles, Birte Melsen, and Karin Vargervik. Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials. *Journal of Craniofacial Surgery*. 1998b;9(4):310–16. doi: 10.1097/00001665-199807000-00004.
82. Meikle, M., S. Papaioannou, T. Ratledge, P. Speight, S. Wattsmith, P. Hill, and J. Reynolds. Effect of Poly DL-Lactide-Co-Glycolide Implants and Xenogeneic Bone Matrix-Derived Growth Factors on Calvarial Bone Repair in the Rabbit. *Biomaterials*. 1994;15(7):513–21. doi: 10.1016/0142-9612(94)90017-5.
83. Kahnberg, K. E.. *Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants*. John Wiley & Sons; 2008.
84. Barradas, AMC, H. Yuan, CA van Blitterswijk, and P. Habibovic. Osteoinductive Biomaterials: Current Knowledge of Properties, Experimental Models and Biological Mechanisms. *European Cells and Materials*. 2011;21:407–29. doi: 10.22203/eCM.v021a31.
85. Caetano-Lopes, J. ,, H. ,, Canhão, and J. E. Fonseca. *Osteoblasts and Bone Formation*; 2007. Vol. 32. 2nd ed. *Acta reumatologica portuguesa*.
86. Yang, Yong-Guang, and Megan Sykes. Xenotransplantation: Current Status and a Perspective on the Future. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(7):519–31. doi: 10.1038/nri2099.
87. Huang, Jeffrey, Jithendra Ratnayake, Niranjana Ramesh, and George J. Dias. Development and Characterization of a Biocomposite Material from Chitosan and New Zealand-Sourced Bovine-Derived Hydroxyapatite for Bone Regeneration. *ACS Omega*. 2020;5(27):16537–46. doi: 10.1021/acsomega.0c01168.
88. Hämmerle, Christoph H. F., and Niklaus P. Lang. Single Stage Surgery Combining Transmucosal Implant Placement with Guided Bone Regeneration and Bioresorbable Materials. *Clinical Oral Implants Research*. 2001;12(1):9–18. doi: 10.1034/j.1600-0501.2001.012001009.x.
89. Haggerty, Christopher J., Christopher T. Vogel, and G. Rawleigh Fisher. Simple Bone Augmentation for Alveolar Ridge Defects. *Oral and Maxillofacial*

- Surgery Clinics of North America. 2015;27(2):203–26. doi: 10.1016/j.coms.2015.01.011.
90. Simion, Massimo, Filippo Fontana, Giulio Rasperini, and Carlo Maiorana. Vertical Ridge Augmentation by Expanded-Polytetrafluoroethylene Membrane and a Combination of Intraoral Autogenous Bone Graft and Deproteinized Anorganic Bovine Bone (Bio Oss). *Clinical Oral Implants Research*. 2007;18(5):620–29. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01389.x.
91. Tadjoeidin, E. S., G. L. de Lange, A. L. J. J. Bronckers, D. M. Lyaruu, and E. H. Burger. Deproteinized Cancellous Bovine Bone (Bio-Oss[®]) as Bone Substitute for Sinus Floor Elevation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2003;30(3):261–70. doi: 10.1034/j.1600-051X.2003.01099.x.
92. Fennis, Jeroen P. M., Paul J. W. Stoelinga, Matthias A. W. Merckx, and John A. Jansen. Reconstruction of the Mandible with a Poly(D,L-Lactide) Scaffold, Autogenous Corticocancellous Bone Graft, and Autogenous Platelet-Rich Plasma: An Animal Experiment. *Tissue Engineering*. 2005b;11(7–8):1045–53. doi: 10.1089/ten.2005.11.1045.
93. Wiltfang, Joerg, Frank Rudolf Kloss, Peter Kessler, Emeka Nkenke, Stefan Schultze-mosgau, et al. Effects of Platelet-Rich Plasma on Bone Healing in Combination with Autogenous Bone and Bone Substitutes in Critical-Size Defects. *Clinical Oral Implants Research*. 2004;15(2):187–93. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.00980.x.
94. Zou, Derong, Lian Guo, Jiayu Lu, Xiuli Zhang, Jie Wei, et al. Engineering of Bone Using Porous Calcium Phosphate Cement and Bone Marrow Stromal Cells for Maxillary Sinus Augmentation with Simultaneous Implant Placement in Goats. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18(13–14):1464–78. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0501.
95. Katagiri, Wataru, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, and Hideharu Hibi. First-in-Human Study and Clinical Case Reports of the Alveolar Bone Regeneration with the Secretome from Human Mesenchymal Stem Cells. *Head & Face Medicine*. 2016;12(1):5. doi: 10.1186/s13005-016-0101-5.

96. Dua, Harminder S., Jose A. P. Gomes, Anthony J. King, and V. Senthil Maharajan. The Amniotic Membrane in Ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*. 2004;49(1):51–77. doi: 10.1016/j.survophthal.2003.10.004.
97. Ganatra M. A. Amniotic Membrane in Surgery. *JPMA*. . The Journal of the Pakistan Medical Association. 2003;53(1):29–32.
98. Burman, Sanghamitra, Sushma Tejawani, Geeta K. Vemuganti, Usha Gopinathan, and Virender S. Sangwan. Ophthalmic Applications of Preserved Human Amniotic Membrane: A Review of Current Indications. *Cell and Tissue Banking*. 2004;5(3):161–75. doi: 10.1023/B:CATB.0000046067.25057.0a.
99. Ravishanker, R., A. S. Bath, and R. Roy. Amnion Bank^c—the Use of Long Term Glycerol Preserved Amniotic Membranes in the Management of Superficial and Superficial Partial Thickness Burns. *Burns*. 2003;29(4):369–74. doi: 10.1016/S0305-4179(02)00304-2.
100. Tseng, Scheffer C. G., Pinnita Prabhasawat, and Shwu-Huey Lee. Amniotic Membrane Transplantation for Conjunctival Surface Reconstruction. *American Journal of Ophthalmology*. 1997;124(6):765–74. doi: 10.1016/S0002-9394(14)71693-9.
101. Branski, Ludwik K., David N. Herndon, Mario M. Celis, William B. Norbury, et al. Amnion in the Treatment of Pediatric Partial-Thickness Facial Burns. *Burns*. 2008;34(3):393–99. doi: 10.1016/j.burns.2007.06.007.
102. Hennerbichler, Simone, Bernd Reichl, Daniela Pleiner, Christian Gabriel, Johann Eibl, et al. The Influence of Various Storage Conditions on Cell Viability in Amniotic Membrane. *Cell and Tissue Banking*. 2007;8(1):1–8. doi: 10.1007/s10561-006-9002-3.
103. Duan-Arnold, Yi, Thomas E. Uveges, Alexandra Gyurdieva, Amy Johnson, and Alla Danilkovitch. Angiogenic Potential of Cryopreserved Amniotic Membrane Is Enhanced Through Retention of All Tissue Components in Their Native State. *Advances in Wound Care*. 2015;4(9):513–22. doi: 10.1089/wound.2015.0638.
104. Ramasamy, Palaniappan, Ramachandran Krishnakumar, Ravichandran Rekha, Baskaralingam Vaseeharan, K. Saraswathi, et al. Bio-Fabrication of Human

- Amniotic Membrane Zinc Oxide Nanoparticles and the Wet/Dry HAM Dressing Membrane for Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9. doi: 10.3389/fbioe.2021.695710.
105. Iezzi, Giovanna, Antonio Scarano, Luca Valbonetti, Serena Mazzoni, Michele Furlani, et al. Biphasic Calcium Phosphate Biomaterials: Stem Cell-Derived Osteoinduction or In Vivo Osteoconduction? Novel Insights in Maxillary Sinus Augmentation by Advanced Imaging. *Materials*. 2021;14(9):2159. doi: 10.3390/ma14092159.
106. Wessing, Bastian, Stefan Lettner, and Werner Zechner. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2018;33(1):87–100. doi: 10.11607/jomi.5461.
107. Soldatos, N. K., P., Stylianou, V. P., Koidou, N., Angelov, R., Yukna, and G. E. Romanos. Limitations and Options Using Resorbable versus Nonresorbable Membranes for Successful Guided Bone Regeneration. *Quintessence International*.; 2017.
108. Gültekin A, Unal AM, Unlu M, and Satoglu S. The Effects of Human Amniotic Fluid and Membrane on Fracture Healing on Rat Fracture Model. *Med J SDU* 2007;27(1):105–12.
109. Ghanmi S., Trigui Moez, Baya Walid, Ellouz Zoubaier, Elfeki Abdelfatteh E, Charfi Slim, et al. The Periosteum-like Effect of Fresh Human Amniotic Membrane on Bone Regeneration in a Rabbit Critical-Sized Defect Model, *Elsevier Bone*. 2018;392–404.
110. Tuncel, Umut, and G. Y. Ozgenel. Use of Human Amniotic Membrane as an Interpositional Material in Treatment of Temporomandibular Joint Ankylosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2011;69(6):e58–66. doi: 10.1016/j.joms.2010.12.044.
111. Tuncel, Umut, Naci Kostakoglu, Aydın Turan, Fatma Markoç, Erkan Gokçe, et al. The Use of Temporalis Muscle Graft, Fresh and Cryopreserved Amniotic Membrane in Preventing Temporomandibular Joint Ankylosis after Discectomy

- in Rabbits. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2014;42(8):1868–76. doi: 10.1016/j.jcms.2014.07.005.
112. Etchebarne, Marion, Jean-Christophe Fricain, Halima Kerdjoudj, Roberta di Pietro, Susanne Wolbank, et al. Use of Amniotic Membrane and Its Derived Products for Bone Regeneration: A Systematic Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9. doi: 10.3389/fbioe.2021.661332.
113. Özgenel, Güzin Yeşim, Gülaydan Filiz, and Mesut Özcan. Effects of Human Amniotic Fluid on Cartilage Regeneration from Free Perichondrial Grafts in Rabbits. *British Journal of Plastic Surgery*. 2004;57(5):423–28. doi: 10.1016/j.bjps.2003.12.021.
114. Karaçal, Naci, Polat Koşucu, Ümit Çobanşlı, and Necmettin Kutlu. Effect of Human Amniotic Fluid on Bone Healing. *Journal of Surgical Research*. 2005;129(2):283–87. doi: 10.1016/j.jss.2005.03.026.
115. Zhang J, Liu Z, Li Y, You Q, Yang J, Jin Y, et al. FGF-2-Induced Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Seeded on a Human Acellular Amniotic Membrane Scaffold Accelerated Tendon-to-Bone Healing in a Rabbit Extra-Articular Model. *Stem Cells Int.*. 2020;6;2020:4701476. doi: 10.1155/2020/4701476. PMID: 32399042; PMCID: PMC7199597.
116. Ragazzo, Mirko, Matteo Val, Giulia Montagner, Diletta Trojan, Stefano Fusetti, et al. Human Amniotic Membrane: An Improvement in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ)? A Case–Control Study. *Cell and Tissue Banking*. 2022;23(1):129–41. doi: 10.1007/s10561-021-09922-y.
117. Chopra, Ratima, Kalyani Bhate, Nishtha Gadkari, Pradnya Kakodkar, et al. Evaluation and Comparison of Human Chorionic Amniotic Membrane and Platelet-Rich Fibrin in Achieving Bone Formation and Soft Tissue Healing in Extraction Sockets Indicated for Rehabilitation with Implants: A Preliminary Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2021;36(2):341–45. doi: 10.11607/jomi. 8344.
118. Akhlaghi, Fahimeh, Nima Hesami, Maryam Rezai Rad, Pantea Nazeman, Farahnaz Fahimipour, et al. Improved Bone Regeneration through Amniotic

- Membrane Loaded with Buccal Fat Pad-Derived MSCs as an Adjuvant in Maxillomandibular Reconstruction. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2019;47(8):1266–73. doi: 10.1016/j.jcms.2019.03.030.
119. Lopez-Martos, Ricardo, Guiomar Martin-Lozano, Rafael-Felix Ocete-Perez, Luis-Miguel Gonzalez-Perez, et al. Application of Human Amniotic Membrane in Temporomandibular Joint Osteoarthritis. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2020;31(4):e424–26. doi: 10.1097/SCS.0000000000006424.
120. Berardinelli P, Valbonetti L, Muttini A, Martelli A, Peli R, Zizzari V, et al. Role of amniotic fluid mesenchymal cells engineered on MgHA/collagen-based scaffold allotransplanted on an experimental animal study of sinus augmentation. *Clin Oral Investig*. 2013 Sep;17(7):1661-75.
121. Aydin H, Saraçoğlu M, Kerimoğlu G, Kerimoğlu S, Topbaş M. İnsan amniyon sıvısının posterolateral spinal füzyon üzerindeki etkileri: Deneysel bir ön çalışma [Effects of human amniotic fluid on posterolateral spinal fusion: an experimental preliminary study]. *Eklem Hastalık Cerrahisi*. 2011 Dec;22(3):166-71. Turkish. PMID: 22085353.
122. Barboni B, Mangano C, Valbonetti L, Marruchella G, Berardinelli P, Martelli A, et al. Synthetic bone substitute engineered with amniotic epithelial cells enhances bone regeneration after maxillary sinus augmentation. *PLoS One*. 2013 May 17;8(5):e63256. doi: 10.1371/journal.pone.0063256. PMID: 23696804; PMCID: PMC3656960.
123. Dziejczak DSM, Francisco JC, Mogharbel BF, Irioda AC, Stricker PEF, Floriano J, et al. Combined Biomaterials: Amniotic Membrane and Adipose Tissue to Restore Injured Bone as Promoter of Calcification in Bone Regeneration: Preclinical Model. *Calcif Tissue Int*. 2021 May;108(5):667-679. doi: 10.1007/s00223-020-00793-1. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33420810; PMCID: PMC8064990.
124. Oner M, Dulgeroglu TC, Karaman I, Guney A, Kafadar IH, Erdem S. The effects of human amniotic fluid and different bone grafts on vertebral fusion in an experimental rat model. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2015 Feb 3;77:35-9.

EKLER
EK-1 ETİK BEYAN

ÖZGEÇMİİ