TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

LEVAN HİDROJELİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ KEMİK REJENERASYONUNDAKİ OSTEOGENEZİS ÜZERİNE ETKİSİ

CELALETTİN YİĞİT AKKÜLAH

UZMANLIK TEZİ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. EBRU TOKSOY ÖNER
Dr. Öğr. Üyesi FERİT BAYRAM

2023-İSTANBUL

I. TEZ ONAYI

II. BEYAN

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

CELALETTİN YİĞİT AKKÜLAH

İmza

III. TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezim ve eğitimim boyunca her konuda bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, üzerimde çok fazla emeği bulunan ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Ebru Toksoy Öner ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferit Bayram'a,

Bana her daim yardımcı olan ve yalnız hissettirmeyen hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Alev Cumbul ve Dr. Öğr. Üyesi Merve Erginer'e

Asistanlık dönemimde her koşulda yanımda olan, bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan saygıdeğer bölüm hocalarıma,

Eğitimim sürecinde birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve desteklerini, yardımlarını esirgemeyen, her zorlukta yanımda bulunan çalışma arkadaşlarıma,

Her daim bana sonsuz sevgi ve desteklerini hissettiren, bugünlere gelmem için hem maddi hem de manevi birçok fedakarlıkta bulunan sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Her türlü desteğiyle yanımda olan, benim için elinden gelen çabayı her daim gösteren, karşılaştığımız zorluklara karşı birlikte mücadele ettiğimiz sevgili eşim Arş. Gör. Dr. Merve Meriç Kahraman Akkülah'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO) tarafından TDH-2022-10547 numaralı proje ile ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1002 projesi kapsamında 122S116 proje numarası ile desteklenmektedir.

IV. İÇİNDEKİLER

I. BEYAN……i

II. TEŞEKKÜR…….....ii

III. İÇİNDEKİLER…….....iv

IV. KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ…….....viii

V. RESİMLER LİSTESİ……x

VI. ŞEKİLLER LİSTESİ……xiii

VII. TABLOLAR LİSTESİ……xv

1. ÖZET……...1

2. SUMMARY……2

3. GİRİŞ ve AMAÇ……3

4. GENEL BİLGİLER……..7

4.1. Kemik Dokusu…… ……..7

4.1.1. Kemik fizyolojisi……7

4.1.2. Kemik dokusunun yapısı…….8

4.1.3. Kemik tipleri……10

4.1.4. Kemik oluşumu……11

4.1.5. Kemik iyileşmesi……..13

4.1.6. Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler……15

4.2. Greft Materyalleri……16

4.2.1. Greft materyallerinin fizyolojisi……...18

4.2.2. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan greft materyallerinin sınıflandırılması……..20

4.3. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu……30

4.3.1. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tanımı ve tarihçesi…….30

4.3.2. Teknik ve önemli hususlar……31

4.3.3. Bariyer membranlar……..33

4.4. Hidrojeller……35

4.4.1. Halomonas levan……...37

4.4.1.1. Ön bilgiler……..37

4.4.1.2. Levan polisakkaritinin sentezi ve içeriği……..37

4.4.1.3. Levan polisakkaritinin fiziksel ve biyokimyasal özellikleri…….39

4.4.1.4. Levan polisakkaritinin etki mekanizması…….41

4.5. *İn Vitro, İn Vivo* Çalışmalar ve Hayvan Modelleri……..42

5. GEREÇ ve YÖNTEM……...48

5.1. Levan Üretimi, Saflaştırılması ve Levan Temelli Hidrojellerin Sentezlenmesi..48

5.2. Levan Hidrojelinin Biyouyumluluğunun İn Vitro Hücre Kültürü Testleri ile Değerlendirilmesi……49

5.3. Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının Temini ve Planlanan Operasyonlarının Gerçekleştirilmesi……...52

5.3.1. Etik kurul onayı, destek veren kuruluş ve projeler……...52

5.3.2. Deney hayvanlarının seçimi, bakımı ve barındırılması……....52

5.3.3. Kullanılan araç ve gereçler……...56

5.3.3.1. Bio-Oss® kemik grefti……...60

5.3.3.2. Bio-Gide® kolajen membran…….61

5.3.4. Çalışma grupları…….....61

5.3.5. Çalışma planı……62

5.3.5.1. Tavşanların anestezi altına alınması……..62

5.3.5.2. Cerrahi bölgenin hazırlanması ve dezenfeksiyonu……63

5.3.5.3. Cerrahi operasyon aşamaları……..65

5.3.6. Çalışmanın sonlandırılması ve örneklerin elde edilmesi……..71

5.4. Örneklerin Radyolojik İncelemelerinin Yapılması……..73

5.5. Doku Örneklerinin Histopatolojik ve Histomorfometrik İncelemelerinin Yapılması……... 85

5.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi……..82

6. BULGULAR……..83

6.1. Klinik Bulgular……83

6.2. Doku Örneklerinin Radyolojik Olarak Değerlendirilmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular……...85

6.2.1. Defekt kapanma oranı……...85

6.2.2. Yeni oluşan kemik hacmi……..86

6.2.3. Yeni oluşan kemik yüzey alanı……87

6.2.4. Trabeküler kemik kalınlığı……88

6.3. Doku Örneklerinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular……..91

6.3.1. Histopatolojik değerlendirme sonuçları……91

6.3.1.1. Yeni kemik oluşumu……..91

6.3.1.2. Fibröz doku oluşumu…….....92

6.3.1.3. Rezidüel biyomateryal……...93

6.3.1.4. Vaskülarizasyon (Yeni damar oluşumu)……95

6.3.1.5. Enflamasyon……..96

6.3.1.6. Kanama……..97

6.3.1.7. Osteoblast yoğunluğu……....99

6.3.2. Histomorfometrik değerlendirme sonuçları……101

6.3.2.1. Defekt kapanma oranı……..101

7. TARTIŞMA ve SONUÇ……102

8. KAYNAKÇA……...115

9. EKLER……134

10. ÖZGEÇMİŞ……..135

V. KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

ADSC: Yağ dokusundan türetilen kök hücreler

AP: Alkalin fosfataz

BMP: Kemik morfogenetik proteinler

BDDE: 1,4-butanediol diglycidyl ether

EhL: Enzimatik hidrolize levan

EHL: Enzimatik levan hidrojeli

EhHL: Enzimatik hidrolize levan hidrojeli

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

HA: Hyaluronik asit

HEMA: Hidroksietil metakrilat

H&E: Hematoksilen&Eozin

HL: Halomonas levan

HS: Halomonas Smyrnensis

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IBSB: Endüstriyel Biyoteknoloji ve Sistem Biyolojisi

KBD: Kritik boyut defekti

LH: Levan hidrojeli

LLLT: Düşük seviyeli lazer terapisi

m-BT: Mikro bilgisayarlı tomografi

MSC: Mezenşimal kök hücreler

NB: Yeni kemik

NVP: N-vinil-2- pirolidon

PCL: Polikaprolakton

PDG: Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri

PEG: Polietilen glikol

PGA: Poliglikolik asit

PLA: Polilaktik asit

PRGF: Trombositten zengin büyüme faktörleri

PTFE: Politetrafloroetilen

PVA: Polivinil alkol

RCT: Randomize kontrollü çalışma

RG: Rezidüel greft

ST: Yumuşak doku

6-SFT: Fruktoz 6-fruktosiltransferaz

6-SST: Sükroz 6- froktosiltransferaz

TCM: Masson Trikrom

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

YKR: Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu

YZBT: Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı

VI. RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Tavşanda insiziv malokluzyon……44

Resim 2. Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan tavşan türüdür…….45

Resim 3a ve 3b. Tavşanlar standart kafeslerinde tek birey olarak barındırılırlar…..53

Resim 4. Tavşanlar standart pelet gıdalarla beslenirler……..53

Resim 5a, 5b ve 5c. Tavşanların anestezisi amacıyla kullanılan anestezikler ……..56

Resim 6. Trefan frez seti……57

Resim 7. Bio-Oss® ksenojenik kemik grefti……..58

Resim 8. Bio-Gide® kolajen membran……..68

Resim 9. Titanyum pin seti; pin, pin kutusu, pin tutucu ve çekiçten oluşmaktadır…59

Resim 10. Elmas separe disk frezi……..59

Resim 11. Operasyon öncesi hazırlanmış cerrahi masa…….....60

Resim 12a ve 12b. Tavşanların operasyon bölgesinin traş edilmesi ve lokal anestezisinin sağlanması……63

Resim 13a, 13b ve 13c. Operasyon öncesi cerrahi sahanın, flaster yardımıyla baş ve boyun bölgesinden sabitlenmesi……64

Resim 14a ve 14b. Cerrahi bölgenin dezenfeksiyonu ve steril örtülerle örtülmesi...65

Resim 15a ve 15b. İnsizyon hattının ve uzunluğunun belirlenmesi……..66

Resim 16a ve 16b. Cerrahi bölgenin inzisyonu ve mukoperiostal flapin kaldırılması……66

Resim 17a, 17b ve 17c. Kalvaryada defektlerin oluşturulması ve dairesel kemik kapaklarının çıkarılması……..67

Resim 18. Tavşan kalvaryasında birbirine simetrik olarak oluşturulmuş dairesel defektler……..68

Resim 19. Steril petri kaplarında Bio-Oss®/levan farklı oranlarda olacak şekilde kombine edilmiştir……..69

Resim 20a ve 20b. Belli oranlarda kombine edilen LH ve Bio-Oss® kemik grefti defektlere uygulanmıştır…….69

Resim 21 ve 21a. Defektlerin üzeri Bio-Gide® kolajen membran ile titanyum pinler kullanılarak örtülmüştür……..70

Resim 22. Cerrahi bölge 3/0 ve 4/0 Pegalact® sütur ile tabakalı olarak kapatılmıştır……70

Resim 23. 8 haftalık takip süreci sonunda cerrahi bölgedeki iyileşmenin görünümü……72

Resim 24a ve 24b. Elmas separe disk yardımıyla kalvaryadan ayrılan parietal kemiğin ve defektlerin görünümü……72

Resim 25a ve 25b. Mikro-BT cihazının görünümü……...74

Resim 26a ve 26b. Tavşan kalvaryalarında yer alan defektler, mikro-BT cihazında radyolojik olarak incelenmiştir……...75

Resim 27. Sterioinvestigator görüntü analiz programında Cavalieri Metodu'nun uygulanması……81

Resim 28. Tavşan kalvaryalarının mikro-BT görünümü……89

Resim 29. İyileşme sonrası defektlerin mikro-BT'deki aksiyel kesit görünümü…...89

Resim 30a ve 30b. Kalvaryal defektlerin mikro-BT'deki sagittal kesit görünümleri…….90

Resim 31a ve 31b. Kalvaryal defektlerin mikro-BT'deki koronal kesit görünümleri…….90

Resim 32. Grup 0,1,2 ve 3'ün yeni kemik dokusu oluşumunun H&E ve TCM boyanmış kesitler üzerindeki görünümü…….92

Resim 33. Grup 0,1,2 ve 3'ün fibröz doku ve rezidüel biyomateryal miktarının TCM boyanmış kesitler üzerindeki görünümü…….....94

Resim 34. Grup 0, 1, 2 ve 3'ün enflamasyon, yeni damar oluşumu ve kanama durumlarının H&E boyanmış kesitler üzerindeki görünümü……98

Resim 35. Grup 0, 1, 2 ve 3'ün osteoblast hücre morfolojisi ve yoğunluğunun H&E boyanmış kesitler üzerindeki görünümü……...100

VII. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. YKR ilkesinin şematik gösterimi……..31

Şekil 2a. Tavşanda kafa kemikleri ve mandibulanın lateralden görünümü……43

Şekil 2b. Tavşanda dişlerin şematik gösterimi……...44

Şekil 3. İnsan osteoblast hücrelerinin, hidrojeller ve Bio-Oss® ile 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı grafiği……50

Şekil 4. Tavşan kalvaryalarında oluşturulan defektlerin şematik gösterimi……...62

Şekil 5. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu defekt kapanma oranlarının yüzdesel olarak karşılaştırılması……85

Şekil 6. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu yeni oluşan kemik hacimlerinin karşılaştırılması……...86

Şekil 7. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu yeni oluşan kemik yüzey alanlarının karşılaştırılması……...87

Şekil 8. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu trabeküler kemik kalınlığının karşılaştırılması……...88

Şekil 9. Grupların yeni kemik oluşum skorlamalarının karşılaştırılması……...91

Şekil 10. Grupların fibröz doku oluşumu skorlamalarının karşılaştırılması……...93

Şekil 11. Grupların rezidüel biyomateryal skorlamalarının karşılaştırılması…….....93

Şekil 12. Grupların vaskülarizasyon skorlamalarının karşılaştırılması…….....95

Şekil 13. Grupların enflamasyon skorlamalarının karşılaştırılması……...96

Şekil 14. Grupların kanama skorlamalarının karşılaştırılması……...97

Şekil 15. Grupların osteoblast yoğunluğu skorlamalarının karşılaştırılması…….99

Şekil 16. Grupların histomorfometrik inceleme sonucu defekt kapanma oranlarının karşılaştırılması…….101

VIII. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Doku takip aşamaları……...77
Tablo 2. Masson Trikrom (TCM) boyama aşamaları……78
Tablo 3. Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama aşamaları…….79
Tablo 4. Histopatolojik skorlama kriterleri……80
Tablo 5. Tavşanlarda serum CRP ve hemogram incelemesi……..84

1.ÖZET

Levan hidrojelinin yönlendirilmiş kemik rejenerasyonundaki osteogenezis üzerine etkisi

Celalettin Yiğit Akkülah, Ebru Toksoy Öner, Ferit Bayram, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D.

Amaç: Levanın yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda, kemik greftileriyle kombine kullanılması durumunda kemik oluşumuna olan etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 8 adet Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı kullanılmıştır. Kalvaryada 4 adet, 8mm çapında, dairesel defekt oluşturulmuş ve Bio-Oss®/Levan, farklı oranda defektlere uygulanmıştır**.** Sekiz haftalık takip süreci sonunda sakrifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Birincil sonuç ölçütü yeni kemik oluşumudur. İkincil sonuç ölçütleri ise defekt kapanma oranı, trabeküler kemik kalınlığı, kemik yüzey alanı; fibröz doku, vaskülarizasyon, kanama, enflamasyon, osteoblast yoğunluğu ve rezidüel greft miktarıdır. Verilerin analizinde Graphpad Prism 8.3.0 kullanılmıştır, verilerin dağılımının normalliği test edilirken Shapiro Wilk's testi kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımına göre parametrik veya parametrik olmayan testler kullanılmıştır.

Bulgular: İki tavşan postoperatif birinci günde kaybedilmiştir. Altı tavşan ve toplam yirmi dört defektle yapılan incelemelerde gruplar arasında radyolojik olarak yeni kemik oluşumu, defekt kapanma oranı, trabeküler kemik kalınlığı ve kemik yüzey alanı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Histolojik olarak ise yeni kemik oluşumu, vaskülarizasyon ve osteoblast yoğunluğunda gruplar arasında anlamlı fark görülürken ($p<0,05$) diğer verilerde anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Sonuçlar: Bio-Oss® miktarı azaltılmasına rağmen benzer iyileşme ve doku uyumu görülmesi levanın, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda ihtiyaç duyulan kemik grefti miktarını azaltabilecek önemli bir biyomateryal olabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: YKR, levan, hidrojel, tavşan, kalvarya, kemik grefti, mikro-BT.

2. SUMMARY

Effect of levan hydrogel on osteogenesis in guided bone regeneration

Celalettin Yiğit Akkülah, Ebru Toksoy Öner, Ferit Bayram, Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Aim: It is aimed to investigate the effect of levan on bone formation when used in combination with bone grafts in guided bone regeneration.

Materials and Methods: In our study, 8 New Zealand White Rabbits were used. Four 8mm diameter circular defects were created in the calvaria and Bio-Oss®/Levan was applied to the defects at different rates. Sacrification was performed at the end of the eight-week follow-up period. The primary outcome measure is new bone formation. Secondary outcome measures were defect closure rate, trabecular bone thickness, bone surface area; fibrous tissue, vascularization, bleeding, inflammation, osteoblast density and residual graft amount. Graphpad 8.3.0 was used in the analysis of the data, and the Shapiro Wilk's test was used while testing the normality of the distribution of the data. Parametric or non-parametric tests were used according to the distribution of variables.

Results: Two rabbits died on the first postoperative day. In the examinations performed with twenty-four defects in six rabbits, no significant difference was found between the groups in terms of radiological new bone formation, defect closure rate, trabecular bone thickness and bone surface area ($p>0.05$). Histologically, while there was a significant difference between the groups in new bone formation, vascularization and osteoblast density ($p<0.05$), no significant difference was observed in other parameters ($p>0.05$).

Conclusions: Similar healing and tissue compatibility despite the reduction of Bio-Oss® amount indicates that levan may be an important biomaterial that can reduce the amount of bone graft needed in guided bone regeneration.

Keywords: GBR, levan, hydrogel, rabbit, calvaria, bone substitute, micro-CT.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Maksillofasiyal defektlerin onarılması, böylece hastalarda fonksiyon, konuşma ve estetik görünüm gibi işlevlerin yeniden inşa edilmesi, oral ve maksillofasiyal cerrahinin en zorlu işlemlerindendir (Owen, 1971). Çene kemik defektleri travmalar, cerrahi olarak iyi huylu tümörlerin çıkarılması (kistler, diş tümörleri) veya malign neoplazmalar, konjenital anomaliler, kleftler, kemik hipoplazisi, periodontal enflamasyon, diş abseleri veya çekimi, ilerlemiş yaş veya genel hastalıklara bağlı oluşabilmektedir. Çene kemiğinin bütünlüğü, çiğneme sırasındaki uyarımlarla korunur; hastalık veya travmaya bağlı diş kayıpları alveol kemiğinde rezorpsiyona ve defektlere neden olabilir (Kumar ve ark., 2013). Oluşan kemik defektlerinin ise normal anatomik yapıyı korumak, deforme alanın onarılması, estetik restorasyon ve dental implant uygulanması amacıyla onarımları gerekir. İmplantın uzun dönem başarısı, okluzal yükü karşılayabilecek kalınlıkta vital kemik dokusuyla sarılmasına bağlıdır. Alveol kemiğinin rezorpsiyonu, implant tedavisinin yapısal, fonksiyonel ve estetik sonuçlarını tehlikeye atar (Elgali ve ark., 2017).

Sert doku iyileşmesini hızlandırabilmek amacıyla hiperbarik oksijen tedavisi, düşük seviyeli lazer terapisi (LLLT) ve ultrason uygulaması gibi mekanik tedavilerin yanı sıra; kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), lokal/sistemik ajan uygulamaları, büyüme faktörleri yardımcı uygulamalar olarak tercih edilebilmektedirler (İşler ve ark., 2010).

Günümüzde kemik deformasyonlarının tedavisi için blok greftleme, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR), distraksiyon osteogenezi, büyüme faktörleri ve kök hücre tedavisi dahil olmak üzere birçok teknik geliştirilmiştir (Titsinides ve ark., 2019).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, Melcher tarafından 1976 yılında periodontal defektlerin tedavisi amacıyla yeni bir konsept olarak ortaya atılmıştır (Melcher, 1976). Dahlin ve arkadaşları ise 1988 yılında YKR'yi ilk kez alveolar kret defektlerinin tedavisi için kullanmış ve tanımlamışlardır (Dahlin ve ark., 1988). YKR'nin temel prensipleri birçok araştırmacı tarafından kapsamlı bir şekilde raporlanmıştır. (Linde ve ark., 1993; Hammerle ve Jung, 2003). Alveolar kret defektlerinin ogmentasyonu için uzun dönem prognozu iyi olan çok yönlü ve etkili bir tekniktir (Rakhmatia ve ark., 2013). İmplant uygulamalarının yaklaşık %40'ında yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu operasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Elgali ve ark., 2017).

Çeşitli greft materyalleri YKR'de, defektlerin ogmentasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Kemik materyallerinin geleneksel sınıflaması; otojenik, allojenik, ksenojenik ve alloplastik greftler şeklindedir (Misch ve Dietsh, 1993). Otogreftler; osteojenik (osteoblastlar), osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahiptir. Otojen kemiğin, maksillofasiyal bölgedeki özellikle geniş lateral ve vertikal kemik defektlerinin onarımı için altın standart olduğu kabul edilse de greftin alınması sırasında donör saha morbiditesi oluşması ve alınan greft miktarının sınırlı olması önemli dezavantajlarıdır. Bu sebepten ötürü ksenojenik, allojenik ve alloplastik kemik greftlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır (Saulacic ve ark., 2021b).

Doğal polisakkaritler kökenleri, antioksidan, antiinflamatuar, yara iyileştirici, hücre göçünü yönlendirici ve hücre bölünmesini indükleyici etkileri gibi biyoaktiviteleri, düşük immün yanıt oluşturma ve düşük toksisite gibi özellikleri sebebiyle sentetik materyallere göre daha üstündürler. Bitki, deniz, hayvan ve bakteriyel kaynaklı çeşitli doğal polisakkaritler mevcuttur. Yüksek ölçekli üretim ve saflaştırma avantajları ile düşük immün yanıt oluşturma özellikleri göz önüne alındığında bakteriyel kaynaklı polisakkaritler diğerlerine üstünlük sağlamakta ve başlıca tıp ve sağlık alanı olmak üzere birçok alanda önemli çalışmalarda tercih edilmektedirler. Levan, pullulan, kurdlan ve bakteriyel selüloz sıklıkla kullanılan doğal polisakkaritlere örnek verilebilir (Demirci ve ark., 2020). Diğer yandan levan, güçlü

doku adezivliği, düşük iç viskozitesi ve yüksek biyouyumluluk ve su tutma kapasitesi gibi üstün fonksiyonel ve yapısal özellikleriyle diğer doğal polimerlerden ayrılmıştır. Bunlara ek olarak antioksidan, prebiyotik ve hipoglisemik karakteristikleri sayesinde ilaç, gıda, kozmetik, kimya ve diğer endüstrilerdeki çeşitli uygulamalarda kendine yer bulmuştur (Oner ve ark., 2016).

Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Biyoteknoloji ve Sistem Biyolojisi (IBSB) araştırma grubu 2008 yılından bu yana Halomonas Smyrnensis (HS) halofilik bakterileri tarafından üretilen levanın (Halomonas levan, HL) farklı kullanım alanları üzerine yoğunlaşmıştır. HL üzerinde yapılan çalışmalar bu materyalin, antioksidan, heparin mimetik (Erginer ve ark., 2016) ve antikanser (Sarilmiser ve Öner, 2014) aktiviteler sergilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca lazerle desteklenmiş nanoyapılı biyoaktif yüzeyler (Axente ve ark., 2014) yapışkan ve çok tabakalı film yapısı (Costa ve ark., 2013) ile sıcağa duyarlı hidrojeller (Osman ve ark., 2017) ve doku mühendisliği uygulamaları (Avsar ve ark., 2018; Sezer ve ark., 2017) gibi birçok değerli alanda fonksiyonel materyal olarak kullanılabilir olduğu gösterilmiştir.

Biyomedikal araştırmalar, klinikte uygulanabilecek deneysel sonuçlar üretmeyi amaçlar. Bu amaçla yapılan kemik mühendisliği çalışmalarında, travma ya da malignite gibi nedenlerle kaybedilen kemiğin yenilenmesi ve işlevinin eski haline getirilmesi amaçlanır. Kemik mühendisliği çalışmalarında kullanılan *in vitro* modellerin klinik ortamlarda uygulanılabilirliğinin test edilebilmesi için *in vivo* (hayvan vb.) modellerle çalışmalar yapılması gerekir (Mcgovern ve ark., 2018). Hayvan modelleri tıp ve diş hekimliğindeki temel keşifler, fizibilite ile birlikte biyoaktivite testi, klinik modelleme ve etkinlik tahmini gibi çalışma alanlarında kritik rol oynar (Muschler ve ark., 2010). *In vivo* araştırmalarda kullanılan hayvan modelleri, kemikle ilgili biyomedikal araştırmalarda kullanılmak üzere, fizyolojik ve patolojik koşullarla ilgili verilerin toplanabilmesine izin verir (Gomes ve Fernandes, 2011).

Çok uzun yıllardır sürdürülen çabalara rağmen mükemmel kemik rekonstrüksiyon materyali henüz geliştirilememiştir. Bu amaç için yapılan çok sayıda laboratuvar çalışması olmakla birlikte ancak az sayıda klinik çalışma yapılabilmektedir. Bu durumun önemli nedenlerinden biri kraniyomaksillofasiyal uygulamalardaki kemik greftlerinin maliyet marjıdır. Maliyetlerin yüksekliği biyomateryal pazarını karmaşık ve pahalı üretim süreçleri nedeniyle sınırlandırmaktadır. Sonuç olarak günümüzde sadece birkaç kemik grefti, kraniyomaksillofasiyal pazarı domine etmektedir. Bununla birlikte, daha yüksek biyoaktivite ve mekanik dayanıma sahip, uygun maliyetli yöntemlerle imal edilen yeni nesil biyomateryallere artan bir talep vardır (Haugen ve ark., 2019). Ayrıca kemik, yaralanma sonucu yeniden oluşum yeteneğine sahip, şekil ve işlevini yeniden kazanabilen, iyileşme kapasitesi yüksek bir dokudur. Bununla birlikte büyük defektlerin sadece doğal sürecine bırakılarak iyileşmesi mümkün değildir. Bu durum nedeniyle biyomateryaller üzerine yapılan çalışmalar, oral ve maksillofasiyal cerrahiyle birlikte diğer birçok tıp branşında büyük ilgi görmektedir. Daha önce farklı amaçlar için çalışması yapılmış olan levan polisakkaritinin maksillofasiyal ve oral cerrahiyle ilgili literatürde yapılmış olan bir çalışması bulunmamaktadır.

Bu çalışmadaki hipotezimiz levan hidrojelinin kemik greftileriyle kombine edilerek defekt bölgesine uygulanması sonucunda hem yeni kemik oluşumu miktarını artıracağı hem de kemikleşme süresini hızlandıracağıdır. Bu sayede ihtiyaç duyulan greft miktarının azaltılmasına katkı sağlayıp, hastalara tedavi sırasında çıkabilecek maliyetin düşürülebileceği öngörülmüştür. *In-vitro* öncü deneylerden elde ettiğimiz sonuçlarda da kemik hücrelerinin, levanla kombine edilmiş Bio-Oss® kemik greftlerine daha fazla tutunup çoğaldığı gözlemlenmiştir. Bu hipotezimizi test etmek amacıyla her bir tavşan kalvaryasında oluşturduğumuz birbirine simetrik 4 defektten 3'üne Bio-Oss®/levan farklı oranlarda uygulanırken (çalışma grupları), 1 defekte sadece Bio-Oss® ksenojenik kemik grefti uygulanmıştır (kontrol grubu). 8 haftalık takip sürecinde 2 haftalık periyotlarla hemogram ve serum CRP ölçümü yapılarak, levanın doku uyumu ve sistemik etkileri incelenmiştir. 8 hafta sonunda defektlerdeki iyileşmelerin tespit edilip karşılaştırılabilmesi için radyolojik ve histolojik olarak incelemeler yapılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Kemik Dokusu

4.1.1. Kemik fizyolojisi

Kemik, vücuda hareket ve mekanik güç sağlamasının yanı sıra, organların korunması, kan hücresi üretimi ve mineral depolama gibi çok önemli işlevlere sahiptir. Vücuttaki diğer birçok organ gibi dinamik olarak düzenlenir, sürekli bir büyüme ve yeniden şekillenme durumundadır. Kemik dokusu, maruz kaldığı streslere yeni kemik oluşumuyla cevap verebilir (Burrow ve ark., 2018).

Mekanik yükleme, kemik yoğunluğunu artıran temel faktördür. Yükleme fenomeni ilkesi ilk olarak Frost (Frost, 2003) tarafından gündeme getirilmiştir ve Mekanostat teorisi olarak da bilinir. Bu teoriye göre kemik dokusunda bulunan osteositler mekanik kuvvetleri algılar ve oluşturduğu sinyalleri osteoblastlara ve osteoklastlara ileterek yeniden şekillenme sürecinde kritik bir rol oynar. Bunun sonucunda da iskelet homeostazı korunmuş olur (Klein-Nulend ve ark., 2013).

Mikroanatomik yaklaşıma göre; kemikler yeniden şekillenme özelliğine sahip özelleşmiş bağ dokusudur. Ostoblastlar, osteoid adı verilen bir madde salgılar. Osteoidin bileşenleri osteokalsin ve kondroitin sülfattır. Kemiğin kalsifikasyonu için ostoidin fosfat ve kalsiyum gibi inorganik bileşenlerle mineralize hale gelmesi gerekir. Bu inorganik bileşikler beslenmeyle alınır. Kemik dokusu; ihtiyaç duyulması halinde vücudun kullanabileceği mineral deposudur (Hong ve Kim, 2018).

Yeniden şekillenme, apozisyon ve rezorpsiyonun bir kombinasyonu olarak meydana gelmektedir. Apozisyondan osteoblastlar, rezorpsiyondan ise osteoklastlar sorumludur. Osteoklastlar; Howship lakünalarında üretilmiş çok çekirdekli makrofaj hücreleridir (Cowan, 2018).

4.1.2. Kemik dokusunun yapısı

Özelleşmiş bir bağ dokusu olan kemik histolojik olarak; hücreler, ara madde ve kolajen liflerden oluşmuştur. Kemiğin iç yüzeyini örten bağ dokusuna endosteum, dış yüzeyini örten bağ dokusuna ise periosteum denilmektedir (Öber, 2006).

Periosteum, kemiğin dış yüzeyini kaplayan özelleşmiş bir bağ dokusudur. İki katmandan oluşmaktadır: iç kısımda osteoblast benzeri hücreler yer alırken; fibröz yapıya sahip dış katman ise fibroblast, kolajen ve elastinden zengin, damar ve sinir ağlarından oluşmaktadır (Blaisdell, 1925). Periosteum mekanik stabilitesi güçlü olan bir dokudur (Allen ve ark., 2004).

Endosteum, mezenkimal hücrelerden zengin ve yoğun mikrovasküler ağa sahip özelleşmiş bir bağ dokusudur (Brighton ve ark., 1992). Kemiğin metabolizmasından ve yenilenmesinden sorumludur (Szabó ve ark., 2017).

Kemik hücreleri

Osteoprogenitör hücreler

Mezenşimal kök hücrelerdir. Bu hücreler iğsi yapıya sahiptir ve çekirdekleri ovaldir. En çok endosteum, havers kanalları, periosteum, medüller kanal ve volkmann kanallarında bulunur (Gartner, 2007), osteoblastlara ve osteositlere farklılaşır. Rejeneratif ve immünsupresif özellikleri sayesinde tıpta çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2013).

Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik oluşumundan sorumlu olgunlaşmamış mezenkimal kök hücreleridir. Mononüklit küboid yapıya sahiptirler (Gürler ve Bozer, 2022). Osteoblastlar, alkalen fosfatazın (AP) üretilmesinde görevlidirler. AP, kemik matriksinin mineralize olmasında rol oynayan önemli bir enzimdir, kalsiyum tuzları ve fosforun kandan çökelmesini sağlar (Ehara ve ark., 2003).

Osteoklastlar

Osteoklastlar , polinüklit yapıda dev hücrelerdir. İntegrinleri aracılığı ile kemik matriksindeki vitronektin proteinine bağlanır. Bağlandığı bölgede asit ve proteaz salgılayarak kemiği rezorbe eden mikro-ortam oluşturur, kemik matriksindeki minerallerin çözünmesini sağlar (Ehara ve ark., 2003).

Kemik matriks

Kemik matriksi, kemik dokusunda kemik hücrelerinin arasını dolduran maddedir. Organik ve inorganik olmak üzere iki bölümden oluşur (Junqueira ve ark., 2006).

Organik madde

Çoğunluğunu Tip-1 kollajen (%90) oluşturur, geri kalan kısmında glikozaminoglikan ve glikoprotein bulunmaktadır (Tresguerres ve ark., 2006).

İnorganik madde

Kalsiyum fosfat ile kalsiyum karbonat en çok bulunan minerallerdir. Magnezyum hidroksit, magnezyum sülfat ve kalsiyum florit bulunmaktadır. Yaş ilerledikçe kalsiyum ve fosfatlar birleşerek hidroksiapatit kristallerini [Ca10(PO4)6(OH)2] oluşturur (Akay, 2001; Tuskan, 2002).

4.1.3. Kemik tipleri

Kemik yapısı histolojik olarak ikiye ayrılır. Bu histolojik ayrım osteositlerin ve kollajen liflerin düzenlenmesine göredir:

Primer Kemik (Örgü Kemik)

Örgü kemikte kolajen lifler düzensiz şekilde dizilmiştir. Kemik gelişimi ve onarımının meydana geldiği osteoentegrasyon sürecinde görülür. Mineral yoğunluğu düşük seviyededir bu sebepten ötürü radyolojik görüntülerde düşük radyoopasiteye sahiptir (Fanghänel ve ark., 2008).

Sekonder Kemik (Lameller Kemik)

Lameller kemik, havers sistemi ya da osteon adı verilen sistemlerden oluşmuştur. Havers sistemi; kollajen lifler ve matriksin, osteonlar etrafında 3-7 mm kalınlığında lameller oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Lameller arasına osteositler yerleşmiştir. Havers kanalları nörovasküler yapıları içerir ve periosteum ve kemik iliği boşluğu arasındaki bağlantıyı sağlar. Volkmann kanalları, Havers kanallarını horizontal olarak kesen ve dışa açılan daha büyük kanaldır. Tüm bu sistemler hassas ve karmaşık bir şekilde kemik dokusundaki mikrosirkülasyonu oluşturmaktadır (Filler ve ark., 2003).

Sekonder kemik; kanselöz (spongiyöz, süngerimsi) ve kortikal (kompakt, sıkı) olmak olmak üzere iki şekilde görülür. İnsan iskeletinin %80'i spongiyöz kemikten oluşurken, %20'si kompakt kemikten oluşmuştur (Tunçay Ekin, 2013).

Kortikal (Kompakt, Sıkı) Kemik

Kortikal kemik, havers (osteon) sistemi olarak adlandırılan birimlerden oluşmuştur. İnsan vücudundaki tüm kemiklerin dış yüzeyi kortikal kemik ile örtülüdür. Kısa kemiklerde merkezde spongiyöz kemik olup dış yüzeyde kortikal kemik varken; uzun kemiklerde diafiz kısmında kortikal kemik bulunur ve medullar kaviteye bakan kısmı az da olsa spongiyöz kemikten oluşmuştur (Özer, 2011).

Spongiyöz (Süngerimsi, Kanselöz) Kemik

Yüksek trabeküler yapıya sahip kemiklerdir. Bu trabeküler yapı kemik iliği dokusunu içerir, kortikal kemiktan farklı olarak Havers ve Volkmann kanalları bulunmaz. Özellikle yassı kemiklerin iç kısmında, uzun ve kısa kemiklerin epifiz ve metafiz bölgelerinde bulunur (Özer, 2011).

4.1.4. Kemik oluşumu

Kemikleşme (ossifikasyon, osteogenez), embriyolojik gelişimin altıncı veya yedinci haftalarında başlar ve ortalama yirmi beş yaşına kadar devam eder. İntramembranöz ve endokondral kemikleşme olmak üzere ikiye ayrılır. İntramembranöz kemikleşme kafatası, klavikula ve kraniyum gibi kısa kemiklerde görülür. Endokondral kemikleşme ise uzun kemikler ve aksiyal iskeletin geri kalan kısmında görülür (Breeland ve ark., 2019).

İntramembranöz Kemikleşme

Mezenşimal dokunun doğrudan kemik dokusuna dönüşmesi içeren kemikleşme türüdür. Osteoblastlar mineralize olmamış kemik matriksi olan osteoidi salgılarlar. Kalsiyum, osteoid ile birleşerek matriksin mineralize olmasını ve osteoblastların osteositlere dönüşmesini sağlar. Osteoblastların salgıladığı osteoidler, kan

damarlarının etrafını çevreleyerek trabeküler (kansellöz, spongiyöz) kemiğin oluşmasını sağlar. Periosteumun iç yüzeyindeki mezenşimal hücreler osteoblastlara farklılaşır ve osteoblastlar osteoid salgılayarak tabakaları oluşturur böylece kortikal kemik meydana gelir (Muzio ve ark., 2007).

Endokondral Kemikleşme

Mezenşimal hücreler kondrositlere farklılaşır ve oluşan kondrositler, kıkırdak modelini oluşturmak için kıkırdak matriksini üretirler. Kıkırdak modeli, hyalin kıkırdak ve perikondriyum adı verilen zardan oluşur. Kondrositlerin hipertrofiye uğraması ve matrisin mineralizasyonu sonucu besinlerin kondrositlere ulaşması engellenir ve hücre ölümü meydana gelir. Apoptoz sonrası kıkırdak dokuda meydana gelen boşlukların içine çok sayıda kan damarları yerleşir ve bunun sonucunda perikondiriyum, periosteuma dönüşür. Osteoblastlar daha sonra diyafizde, kalınlaşmış kemik alanı oluşturur. Kemik, diyafiz bölgesindeki kıkırdak dokusunun yerini alırken; kondrosit hücreleri, kemiğin uç kısmında çoğalmaya devam ederek kemik uzunluğunun arttırılmasını sağlarlar. Bu çoğalma alanları, doğumdan sonrası ve ergenlik döneminde, kemiklerin boyuna büyümesini sağlayan büyüme plakları haline gelir (Rauch ve Glorieux, 2004).

Başarılı kemik oluşumu için en önemli faktörlerden biri hızlı neovaskülarizasyondur (Saad ve ark., 2015). Anjiyogenez, başta kan damarı büyümesini uyaran VEGF olmak üzere birçok büyüme faktörüne bağlıdır (Keramaris ve ark., 2008). Azalmış kemik vaskülaritesinin, bozulmuş kemik oluşumu ve artmış kemik rezorpsiyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Glowacki, 1998).

4.1.5. Kemik iyileşmesi

Yaşam boyu hücre yapımı ve yıkımı belirli bir düzen içerisinde devam eder. Kemik dokusunda hasar durumunda önemli fizyolojik süreçler meydana gelir ve kemik dokusu kendini yara dokusu oluşmaksızın yenileyebilir (Kılıçoğlu, 2002).

Kemik dokusunun rejenerasyonu, kısmen örtüşen birkaç faz içerir. Anabolik fazda, hücreler defekt bölgesine toplanır, kıkırdak yapısında bir kallus ve yeni kan damarı oluşumu sağlanır. Kondrosit apoptozunu takiben katabolik fazda kıkırdak rezorpsiyonu ve ikincil kemik oluşumu meydana gelir. Osteoblast ve osteoklast aktivitesi burada büyük önem taşır ve hassas bir şekilde dengelenir. Son olarak, defekt bölgesinin yeniden şekillenmesi, rejenere kemik ile sonuçlanır (Einhorn ve Gerstenfeld, 2015).

Kemiğin hasar sonrası iyileşme süreci; enflamatuar dönem, onarım dönemi ve yeniden şekillenme (remodelasyon) dönemlerinden oluşur ve yaklaşık 16 hafta sürer (Kılıçoğlu, 2002):

Enflamatuar Dönem (1-4 gün)

Kemikte travmaya karşı ilk yanıt olarak enflamasyon meydana gelmektedir. Hasarlı bölgede lenf sıvısı ve kan birikimi meydana gelir, pıhtılaşmadan sorumlu olan faktörler bölgeye göç eder ve sinyal molekülleri salınmaya başlar, hematom meydana gelir. Hematom bölgesinden, hücre tamirinden ve göçünden sorumlu proteinler, büyüme faktörleri ve trombositler salınır (Gartner, 1997).

Dokudaki hasar sonrası ilk 24 saat içinde sırasıyla; damarlarda kısa süreli daralma, histamin salgısı artışı sebebiyle arteriol ve venüllerin genişlemesi, plazmanın damar

dışına çıkışına bağlı ödem meydana gelir. Meydana gelen hematom, sonraki 48 saat içinde organize olarak; daha sonra hücre çoğalmasının başlayacağı fibrinden bir yapı oluşturur (Kılıçoğlu, 2002). Bu aşamada iyileşme periosteum ve endosteumdan vasküler invazyona bağlıdır (Clark, 2001).

Onarım Dönemi (2-40 gün)

Defekt bölgesinde 48 saat sonunda oluşan granülasyon dokusundan kaynaklanan bağ dokusu kaynaklı pluripotent hücrelerin rol aldığı onarım donemi 7-12 gün sürer. Bu bölgede ilk değişikliğe uğrayan fibroblastlar kolajen; kondroblastlar kondroid ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoid salgılarlar. Damarlanmanın daha yoğun olduğu kemiğe yakın bölgelerde hücreler osteoblastlara dönüştüğünden bu bölgede trabeküller, orta kısımda kondroblast ve kondrositlere farklılaşan hücreler sayesinde kıkırdak doku, en dışta da periosteum bulunur (Miller, 1996). Kemik hasarı meydana geldikten 7- 12 gün sonra fibröz ve kıkırdak doku içeren kallus oluşur. Kallus mineralizasyonu 4. ve 16. haftalar arasında gerçekleşir (Miller, 1996).

Yeniden Şekillenme (Remodelasyon) Dönemi (25-100.gün)

En uzun süren kemik iyileşme dönemidir. Kallus, lameller kemiğe dönüşerek daha düzenli bir hal alır. Bu dönem 4-16 hafta veya daha uzun sürebilir. Kemiğin erken dönemdeki vitalitesi, yeniden modellenme için kritik bir öneme sahiptir (Clark, 2001).

Kemik yeniden şekillenmesi, kemik matris sentezi ve mineralizasyonundan oluşan sürekli bir süreçtir. Bu işlem için gerekli olan kalsiyum metabolizması üç hormon tarafından düzenlenir; paratiroid hormonu (PTH), D vitamini (kalsitriol) ve kalsitonin. PTH, 84 amino asitten oluşan endojen bir proteindir. Özellikle kemiklerin yeniden şekillenmesi, böbrekler ve bağırsaklar üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileri vardır. Ayrıca kandaki optimal kalsiyum iyonu konsantrasyonunu korumak için

sürekli olarak hareket eder ve osteoporoz tedavisinde kullanılır (Aggarwal ve Zavras, 2012; Li ve ark., 2013).

Wolf ve arkadaşları, stres ve kemiğin işlevi arasındaki ilişkiyi açıklamışlardır. Bu kanuna göre; strese maruz kalan kemiğin iç yüzeyinde osteoblastik aktivite ie kemikleşme olurken; dış yüzeyinde ise osteoklastik aktivite sebebiyle rezorpsiyon meydana gelmektedir (Brond, 1990).

4.1.6. Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler

Yaş

Yaş ilerledikçe kemikleşme, defekt bölgesinin onarılması ve hücrelerin yenilenmesi yavaşlar (Serin, 2022).

Sistemik durum ve kullanılan ilaçlar

Diyabet, beslenme bozuklukları, tüberküloz, raşitizm, kronik hastalıklar, iltihabi hastalıklar, hiperemi ve anemi gibi sistemik durumların varlığında kemik iyileşmesinde gecikmeler olduğu belirtilmiştir (Öber, 2006).

Kondroitin sülfat, hiyalüronidaz, L-Dopa, klonidin ve dikumaral kemik iyileşmesine yardım eden ilaçlardır (Lo Muzio ve ark., 2007). Düşük seviyeli lazer uygulamasının da sert doku iyileşmesinde etkili olduğu, son dönemlerde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Özyurt ve ark., 2018). Yine son zamanlarda yapılan çalışmalarda, 2-3 atm basıncında, günde ortalama iki saat kadar uygulanan hiperbarik oksijen tedavisinin iyileşme üzerindeki olumlu etkileri ortaya konmuştur (Serin, 2002).

Hormonlar

Kalsitonin ve parathormon (PTH), kemik iyileşmesi üzerinde etkili olan başlıca hormonlardır. Birbirine antagonist olarak çalışan bu iki hormandan kalsitonin, kemik onarımını arttırdığı için iyileşmeye olumlu yönde katkı sağlar. PTH ise osteoklastik aktiviteyi arttırarak yeniden şekillenmeyi; osteositleri uyararak da osteolizisi hızlandırır (Doğan ve ark., 2001). İnsulin, tiroit ve büyüme hormonlarının kemik iyileşmesini artırırken; kortizon ise kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkiler (Serin, 2002).

Vitaminler

A, C ve D vitaminleri eksik veya aşırı alındıklarında kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilerken, normal dozlarında alındıkları zaman iyileşmeyi olumlu yönde etkilerler (Kaplan ve ark., 2004; Yılmaz ve ark., 2001; Dewey, 2001).

4.2. Greft Materyalleri

Periodontal hastalık, diş kaybı, odontojenik ve nonodontojenik kist ve tümörler, fasiyal ve dentoalveolar travma gibi birçok patolojik durum çene ve yüz kemiklerinde kemik kaybına sebep olabilmektedir (Tolstunov ve ark., 2019). Küçük defektlerden maksillektomi ve mandibulektomi defektlerine kadar farklı boyut ve şekillerde meydana gelen defektler rekonstrüktif cerrahi ile tedavi edilebilirler (Hupp ve Elis, 2008). Rekonstrüktif cerrahi; kemiğe yeterli boy, genişlik, hacim ve kontür sağlamak amacıyla uygulanmaktadır. Bu sayede yumuşak dokunun da uyumuyla gerekli olan fonksiyon ve estetik yeniden sağlanmış olur (Miloro ve ark., 2004; Miranda ve ark., 2006).

Kemik dokusu, kandan sonra transplantasyonu en çok gerçekleştirilen ikinci dokudur (Fernandez de Grado ve ark., 2018). Kemik defektlerinin ogmentasyonu amacıyla çeşitli greft materyalleri kullanılmaktadır. İdeal bir kemik grefti: (1) hücre-biyomateryal etkileşimini, hücre yapışmasını, ekstra-selüler matriks çökmesini desteklemeli, (2) hücrelerin hayatta kalabilmesi, proliferasyonu ve farklılaşması için gazların, besinlerin ve düzenleyici faktörlerin taşınmasına izin vermeli, (3) doku rejenerasyonu oranıyla benzer hızda rezorbe olmalı, (4) *in-vivo* olarak minimal derecede enflamasyon ve toksisiteye neden olmalıdır (Langer ve Tirrel, 2004). Bununla birlikte greft materyalinin morbiditesinin düşük, volümetrik stabilitesinin yüksek, uygulama sırasında kolayca manipüle edilebilen, pazarda kolay erişilebilen, uzun raf ömrü ve makul üretim maliyetlerine sahip ürünler olması arzu edilmektedir (Bose ve ark., 2012; El-Rashidy ve ark., 2017). Kemik greft materyallerinin geleneksel sınıflaması; otojen, allogreft, ksenogreft ve alloplastik greftler şeklindedir (Misch ve Dietsh, 1993).

Günümüzde kemik defektlerinin ogmentasyonu amacıyla; histolojik özellikleri uyumlu ve immün reaksiyon oluşturmama gibi bir kemik greftinde aranan özellikleri karşıladığı için otojen kemik greftleri özellikle maksillofasiyal bölgedeki geniş lateral ve vertikal defektlerin onarımı için altın standart olarak kabul edilse de greftin alınması sırasında donör saha morbiditesi oluşması, ikinci bir cerrahi gerektirmesi, cerrahi riskin yüksek olması ve sınırlı greft elde edilmesi gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Bu sebepten ötürü ksenojenik, allojenik ve alloplastik kemik greftlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır (Saulacic ve ark., 2021). Özellikle son zamanlarda allogreftler, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve sığır kaynaklı ksenogreftler de Avrupa'da, otogreftlerin yerini almaya başlamıştır (Ebraheim ve ark., 2001; St John ve ark., 2003).

4.2.1. Greft materyallerinin fizyolojisi

Greftler fizyolojik olarak;

*Osteogenezis,

*Osteokondüksiyon,

*Osteoindüksiyon mekanizmaları ile kemik oluştururlar (Kumar ve ark., 2013).

Osteogenezis

Kemik hücrelerini içeren, destekleyen ve besleyen greftler, osteojenik olarak adlandırılırlar. Osteogenezis, greft materyalindeki osteoprogenitör hücrelerin, transplantasyon sonrası sağ kalımıyla beraber önce ostaoblastlara ve sonra osteositlere farklılaşması ile meydana gelir. Osteojenik özellikteki greftlere verilebilecek en iyi örnek, literatürde altın standart olarak kabul edilen otojen kansellöz kemik greftleridir (Giannoudis ve ark., 2005).

Kansellöz otogret; kemik iliğindeki farklılaşmamış mezenşimal kök hücreler (MSC) ile kansellöz kemik tabakasındaki farklılaşmış osteoblastları içerir. MSC, sahip olduğu osteodiferansiyasyon özelliği sayesinde güçlü kemik iyileşme potansiyeli sunar (Yoo ve Johnstone, 1998). Otojen kansellöz greftler kolaylıkla humerus, ilyak krest ve sternumdan elde edilebilirler (Joshi ve Kostakis, 2004).

Osteokondüksiyon

Greftlerin, MSC ve diğer yapıların grefte göç etmelerini ve orada çoğalabilmeleri için çatı (iskelet) görevini üstlenmesi, osteokondüktif özellik olarak adlandırılır. MSC'ler, osteositler, osteoblastlar, kondrositler ve kondroblastların adezyonu ve çoğalması için uygun bir alan sağlayan üç boyutlu materyallerdir. Doğal osteokondüktif özellik gösteren maddelere örnek olarak otojen kansellöz kemik ve deproteinize allogreftler verilebilir. Sentetik maddelere örnek olarak ise trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit, kalsiyum sülfat, biyoaktif cam, kollajen verilebilir (Bucholz, 2002).

Osteoindüksiyon

Doğal kemikteki farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin yeni kemik oluşumu için osteoblast ve kondroblastlara dönüşümünü sağlayan mekanizma osteoindüksiyon olarak adlandırılır. Bu mekanizmada, göç için MSC'ler kullanılır (kemoatraksiyon ve göç), ve sonrasında kallusu oluşturmak amacıyla hücre çoğalmasını uyarır (çoğalma ve farklılaşma) (Joshi ve Kostakis, 2004).

Mezenkimal kök hücrelerin, kemik defekti rekonstrüksiyonu ve rejenerasyonunda uygun ve etkili olduğu gösterilmiştir (Khojasteh ve ark., 2012; Petrovic ve ark., 2012; Machado ve ark., 2012). Otolog yağ dokusundan türetilen kök hücreler (ADSC'ler), kemik greft materyali özelliklerini geliştirmek ve osteojenik hücre hattına doğru farklılaşmak için bir kaynak olarak hizmet edebilir ayrıca anjiyogenezi ve otolog büyüme faktörlerinin salgılanmasını uyararak doku rejenerasyonunu iyileştirebilir ve otolog kemiğin osteoindüktif özelliklerine benzer özellikler taşıdığından otojen kemik alınma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır (Gentile ve ark., 2012; Alvira-González ve ark., 2016). ADSC'lerin, endotelyal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi kemik rejenerasyonundan sorumlu büyüme faktörlerini salgıladığı bilinmektedir (Kleinheinz ve ark., 2002). ADSC'ler ideal bir kök hücre kaynağıdır çünkü kolayca erişilebilirler, kullanımları etik sorunlarla karmaşık değildir, yağ dokusu hızlı rejenerasyona uğrar, ADSC'ler osteojenik hücrelere farklılaşabilir ve düşük immünojenisiteye sahiptir (Song ve ark., 2004; Shanti ve ark., 2007). Bu nedenle bu özellikler, yetersiz kanlanma olan kemik defektlerinde, travma sonrası defektlerde, kemik metabolizmasını düzenleyen hormon dengesizliği olan hastalarda ve sistemik hastalıkları olan hastalarda faydalı olabilir. Aktive trombositler ve lökositler, doku rejenerasyonunu, anjiyogenezi destekleyen ve inflamasyonu modüle eden çok sayıda büyüme faktörünü serbest bırakır (Anitua ve ark., 2012; Khatu ve ark., 2014; Bielecki ve ark., 2007). Bazı yazarlar, trombosit konsantrelerinden lökosit içeriğinin hariç tutulmasını önermektedir (Puidokas ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir sistemik inceleme, artan lökosit sayısının hücre göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını olumsuz etkilediği ve uzun süreli bir inflamasyon fazından sorumlu olduğu sonucuna varmıştır. Trombositten zengin büyüme faktörleri (PRGF)

teknolojisi, beyaz kan hücrelerinin neden olduğu proinflamatuar etkilerden kaçınmak amacıyla lökositlerin yok edilmesini önerir. PRGF, basit ve ucuz bir teknoloji olduğu için kemik rejenerasyonu için büyük bir potansiyele sahiptir (Schnabel ve ark., 2007).

Osteoindüktif maddelere en iyi örnekler demineralize kemik matriksi (DKM) ve büyüme faktörleridir. Büyüme faktörleri kemikte doğal olarak bulunan, kemik gelişiminin aktivasyonundan sorumlu ve yara iyileşme sürecini kontrol eden biyoaktif proteinlerdir. Büyüme faktörleri, dokunun rejenerasyonu için hücre migrasyonu, hücre proliferasyonu ve anjiyogenezde kritik bir role sahiptir (Clark, 2001). Kemik dokusu, kemik morfogenetik proteinler (BMP), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) dahil olmak üzere zengin bir büyüme faktörü kaynağıdır (Simpson ve ark., 2006). Birçok büyüme faktörünün kemik rejenerasyonu ve onarımında kullanım potansiyeli göstermesine rağmen BMP, bugüne kadar açıklanan ve en çok araştırılan faktördür (Chin ve ark., 2005). BMP'ler, osteoprogenitör hücrelerin osteojenik hücrelere farklılaşmasını hızlandırabilen ve daha hızlı kemik oluşumu ile sonuçlanan en güçlü osteoindüktif büyüme faktörüdür (Boyne ve ark., 2005). Biyomateryallerle karıştırılarak kemik oluşumunu teşvik etmek için kullanılabilmektedir (Valentin-Opran ve ark., 2002).

4.2.2. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan greft materyallerinin sınıflandırılması

Kemik greftleri; embriyolojik kökenleri, histolojik yapıları, form ve kan desteklerine göre sınıflandırılabilirler. Greft materyalleri embriyolojik kökenlerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

1.Otojenik greftler; hastanın kendisinden temin edilen alıcı ve verici bireyin aynı kişi olmasından ötürü antijenik özellik göstermeyen greftlerdir*; izojenik greftler* ise ikiz bireyler arasında aktarılan greftlerdir, aynı antijenik özellikleri paylaşırlar.

2.Allogreftler; alıcı ve verici iki farklı insandır. Antijenik özellikleri ortadan kaldırmak için işleme tabii tutulurlar ve verici olarak daha çok kadavralar tercih edilirler.

3.Ksenogreftler; farklı türlerden (sığır, domuz, mercan, alg vs.) temin edilen greftlerdir.

4.Sentetik üretilen kemik greftleri (Alloplastlar); doğal kemiğe alternatif olabilmek için laboratuvar ortamında elde edilen greftlerdir (Buser ve ark. 1999; Malinin ve ark., 2014).

İdeal kemik grefti;

- Osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahip olmalı,
- Minimum morbidite ve komplikasyona sebep olmalı,
- Antijenik, kanserojen ve teratojenik reaksiyonlara sebebiyet vermemeli,
- Yeterli miktarda elde edilebilmeli,
- Yeterli stabilite ve dayanıklılığa sahip olmalı,
- Düşük maliyetli olmalı,
- Anjiyogenezisi uyarmalı,
- Kullanımı kolay olmalı,
- Hidrofilik yapı içermelidir (Janicki ve Schmidmaier, 2011).

Otogreftler (Otojenik greftler)

Otogreftler, hücrelerin canlılığını koruması ve mezenşimal kök hücrelerinin farklılaşmasını sağladığından yani osteojenik özelliklerinden dolayı altın standart olarak kabul edilir. İmmunolojik reaksiyon ve konak red cevabı riski, alıcı ve verici

birey aynı olduğundan sıfırlanmıştır. Başarı oranı %95 ve üzeridir (Sakkas ve ark., 2017). Birçok avantajının yanı sıra; verici saha morbiditesi, ikinci bir cerrahi işlem, sınırlı kaynak gibi dezavantajları da söz konusudur (Chiapasco ve ark., 2009).

Otogreftler, intraoral ve ekstraoral donör sahalardan elde edilebilir. İntraoral bölge ulaşım kolaylığı, alıcı sahaya benzerlik , daha düşük postoperatif morbidite riski ve cilt yarasına sebep olmaması gibi önemli avantajları sayesinde daha çok tercih edilirken; daha büyük defektlerin onarımı amacıyla veya daha geniş hacimde kemik dokusu gerektiğinde ekstraoral bölgeler tercih edilebilmektedir ancak hospitalizasyon ve anestezi ihtiyacının yanı sıra cerrahi deneyim ve uzmanlık düzeyi de operasyonun başarısını etkileyebilen önemli faktörlerdir (Damien ve Parsons, 1991; Saulacic ve ark., 2021).

İntraoral ve ekstraoral otojen greft sahaları

Ekstraoral greft sahaları

Kraniyum;

Yüksek rezorbsiyon direnci, geniş hacimde kemik grefti elde edilebilmesi, yüksek stabilite, düşük donör saha morbiditesi ve skar bölgesinin saçlarla örtülüyor olması gibi avantajlarının yanı sıra; beslenmesinin daha az olması ve operasyon için genel anestezi gerekmesi gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Operasyon sırasında ve sonrasında; epidural hematom, kellik ve dural yaralanmalar görülebilmektedir (Iizuka ve ark., 2004).

Fibula;

Yeterli hacimde kortikokansellöz kemik grefti elde edilebilir ancak genel anestezi ve geniş cerrahi saha gerektirmesi gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Operasyon sonrası ayak bileğinde güçsüzlük, kas zayıflığı ve yara oluşumu meydana gelebilir (Kökat ve ark., 2018).

İliak krest;

Blok greftlemeye uygun olması ve geniş hacimde kemik grefti elde edilebilmesi gibi önemli avantajlarının yanı sıra; yüksek rezorbsiyon potansiyeline sahip olması ve operasyon sırasında genel anesteziye ihtiyaç duyulması dezavantajlarıdır. Operasyon sırasından veya sonrasında ilyak herni, kırık, pelvik instabilite, fistül, üretal yaralanma gibi komplikasyonlar görülebilir (Osborn ve ark., 2018).

Radyus;

Kortikokansellöz kemik içermesi ve genel anestezi gerektirmemesi gibi avantajlarının yanı sıra; verici sahada sınırlı kemik hacmi söz konusudur. Operasyon sonrası dönemde süperfisyal radial sinir nöromaları, lokal yumuşak doku enfeksiyonları, De Quervain tenosinoviti ve kırık gibi durumlar görülebilir (Jeong ve ark., 2017).

Kosta;

Donör sahanın rejenere olabilmesi ve verici sahada yeterli kemik hacmi olması gibi avantajlarının yanında, yoğun kortikal kemik yapısına sahip olmasından ötürü beslenmesi düşüktür. Operasyon sırasında veya sonrasında plöritik ağrı, göğüs duvarı depresyonu ve pnömotoraks görülebilir (Lee, 2015).

Tibia;

Lokal anestezi ile operasyon imkânı, geniş kemik hacmi, minimal yara oluşumu gözlenmesinin yanında, düşük kortikokansellöz kemik kalitesi gibi önemli bir dezavantaja sahiptir. Operasyon sonrası dönemde ödem, parestezi, kırık ve yürümede rahatsızlık görülebilir (Atil ve ark., 2016).

İntraoral greft sahaları

Maksiller sinüsün anterior duvarı;

Alıcı ve verici saha birbirine yakındır ve düşük rezorpsiyon oranı gösterir, ancak yoğun kortikal kemik yapısına sahip olduğu için beslenmesi zayıftır. Operasyon sırasında Schneiderian membran perforasyonu meydana gelebilir (Bande ve ark., 2015).

Anterior nasal spina;

Düşük morbidite oranı gösterir ve elde edilmesi kolaydır. İstenilen hacimde kemik grefti elde edilememesi önemli bir sorundur. Operasyon sonrası dönemde estetik görünümde değişiklikler meydana gelebilir (Cho ve ark., 2013).

Mandibular simfiz bölgesi;

Kortikokansellöz kemik içermesi, düşük morbidite oranı ve kolay elde edilebilmesi önemli avantajlarındandır bunun yanı sıra; verici sahadaki yetersiz kemik hacmi ve yüksek postoperatif komplikasyon riski söz konusudur. Operasyon sırasında veya sonraki dönemde mental sinirde parestezi meydana gelebilir, sublingual ve submental artere zarar verilebilir, mandibular diş kökleri zarar görebilir, hematom veya fasiyal kontürde değişiklikler görülebilir (Velásquez ve ark., 2017).

Ramus;

Simfiz bölgesiyle karşılaştırıldığında hastalar tarafından kabul edilebilirliği daha fazladır ancak yoğun bir kortikal yapıya sahiptir, istenilen şekil ve hacimde greft elde edilemeyebilir. Operasyon sırasında veya sonraki dönemde kırık, hematom, trismus, inferior alveolar sinirin ve/veya lingual sinir hasarı görülebilir (Güngörmüş ve Yavuz, 2002).

Koronoid çıkıntı;

Düşük morbidite, minimal yara oluşumu ve kolay elde edilebilir olması gibi avantajlarının yanı sıra; operasyonun hastane koşullarında gerçekleştirilmesi gerekliliği önemli dezavantajıdır. Operasyon sürecinin en önemli koplikasyonları trismus veya trigeminal sinirin bukkal dalının zarar görmesidir (Sabhlok ve ark., 2014).

İnsisiv fossa;

Kemik osteoprogenitör hücreler açısından oldukça zengindir ve kortikokansellöz yapıya sahiptir ancak tip IV kemik özelliği gösterdiğinden ötürü düşük rezorpsiyon direncine sahiptir. Operasyon sırasında diş kökleri zarar görebilir (Peñarrocha ve ark., 2005).

Maksiller Tüber Bölgesi;

Kortikokansellöz kemik yapısına, düşük morbidite oranına sahiptir ve elde edilmesi kolaydır. Hematom ve oroantral fistül oluşumu önemli komplikasyonlarındandır (Tolstunov, 2009).

Damak;

Düşük morbidite oranına sahip olmasının yanı sıra; düşük kemik kalitesi ve cerrahi sahaya ulaşım zorluğu söz konusudur. Operasyon sırasında diş kökleri zarar görebilir ve nazal tabanda perforasyon meydana gelebilir (Hernandez-Alfaro ve ark., 2005).

Torus bölgesi;

Elde edilmesi kolaydır ve düşük morbidite oranına sahiptir ancak çok yoğun kortikal kemik yapısına sahip olduğundan ötürü beslenmesi zordur. Operasyon sırasında ağız tabanındaki vasküler yapılara ve lingual sinire zarar verilme olasılığı vardır (Ganz, 1997).

Zigoma;

Kortikokansellöz yapıya sahiptir ve elde edilmesi kolaydır ancak kemik yoğunluğu düşüktür. Operasyon sırasında oküler komplikasyonlar görülebilir (Kainulainen ve ark., 2004).

Allogreftler (Allojenik greftler)

Kadavra kemiğinden elde edilen greftlerdir. Alıcı ve verici bireyler farklı olduğu için antijenik özellikleri elime etmek ve hastalıkların bulaşmasını engellemek amacıyla çok sayıda işleme tabi tutulurlar (Delloye ve ark., 2007).

Allogreftler; kortikal, kansellöz veya kortikokansellöz yapıya sahip olabilirler (Saulacic ve ark., 2021). Greftlerin kortikal ve kansellöz kemik histolojisi, biyolojik davranışlarında önemli bir rol oynar ve aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Kansellöz greftler, yapısındaki osteoblastlar, osteositler ve mezenkimal kök hücrelerin varlığı nedeniyle osteogenezi uyarır;
2. Stabilite esas olarak osteojenik yeteneği önemli ölçüde eksik olan kortikal greftler tarafından sağlanır, yeni kemik büyümesi çok yavaşken uzun süreli absorpsiyon sergiler;
3. Kortikal ve süngerimsi greftlerin bir kombinasyonu, stabilite ve osteogenezi sağlayabilir;
4. Yeni kemik dokusunun daha hızlı birikme hızı nedeniyle kansellöz kemiklerde artan mekanik güçte de farklılıklar vardır, kortikal greftlerde ise ameliyat sonrası ilk 6 haftadan 6 aya kadar mekanik güç %40 azalır (Roden, 2010).

Allojenik greft tipleri;

Taze Donmuş Kemik (FBA): Enzimatik bozunmaya uğramaması için -800°C dondurulmuş greftlerdir. BMP'lerin varlığı sayesinde osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri en yüksek seviyededir ancak liyofilizasyon, demineralizasyon ve ışınlanma işlemlerinden geçmez, bu sebepten ötürü bulaşıcı hastalık geçişleri ve yüksek derecede alerjik reaksiyon görüldüğünden ötürü günümüzde artık tercih edilmemektedir (Piattelli ve ark., 1997).

Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allografti (FDBA): Dondurma ve dehidratasyon işlemlerinden geçirilerek antijenik özelliği azaltılmış olan greftlerdir. Demineralize edilmemiştir. Sadece osteokondüktif potansiyele sahiptir (Piattelli ve ark., 1997).

Demineralize Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allografti (DFDBA): İnorganik kısmı kemikten elimine edilmiş olan greftlerdir ve organik kısmı BMP'ler açısından oldukça zengindir. Osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon özelliklerine sahiptir *(Malinin ve ark., 2014;* Sheikh ve ark., 2017).

Allojenik greftlerin avantajları;

- İkinci bir cerrahi saha gereksinimini ortadan kaldırır,
- Yeterli boyut, miktar ve şekillerde elde edilebilir,
- Öngörülebilir sonuçlara sahiptir.

Dezavantajları;

- Verici bireyden alıcı bireye hastalık ve patojen taşınma riski vardır,
- Genel anestezi ve hospitalizasyon gerektirir,

- Hepatit B ve C virüsü, HIV ve Treponema serolojik belirteçleri için ek testler yapılması gerekir,
- Kortikal yapıya sahip tip IV kemiktir,
- Greftin yoğun sterilizasyon işlemlerine maruz kalması, enfeksiyon ve hastalık riskini ortadan kaldırsa da proteinlerini ve kemik hücreleri kaybetmiş kemik dokusunda osteojenik ve osteoindüktif özellikler zayıflatılmıştır,
- İmmün reaksiyon riskinin yanında, otojenik greftlere nazaran daha az integrasyon ve revaskülarizasyon oranı görülür,
- Kemik grefti, alıcı sahaya uygulandıktan sonra %12-60 oranında rezorbe olur,
- Allojenik greftler; standart bir yapıya sahip olmadıkları için donörlerin cinsiyeti, yaşı ve tıbbi durumu ile birlikte değişiklik gösterebilmektedir (Delloye ve ark., 2007; Shibuya ve Jupiter, 2015; Tovar ve ark., 2014).

Ksenogreftler (Heterojenik greftler)

Farklı türden vericilerden elde edilen greftlerdir. Yüksek rezorpsiyon direncine sahiptir ve osteokondüktif özellik gösterir. Başka tipteki kemik greftleri veya büyüme faktörleriyle birlikte kombine olarak kullanılabilirler.

Uygun maliyet ve seri üretim gibi avantajlarına rağmen; immünojenitenin uyarılması, hastalık bulaşma riski ve deproteinizasyon işleminin greftin fizikokimyasal özelliklerini etkilemesi gibi önemli dezavantajlara sahiptir (Tovar ve ark., 2014).

Sığır, domuz, at, mercan ve alg kaynaklı olabilen ksenogreftlerden günümüzde en sık kullanılan greft tipi; sığır kaynaklı kemik greftleridir (Titsinides ve ark., 2019).

Sığır Kökenli Kemik Greftleri: Liyofilize ve deproteinize bir yapıya sahip olan bu kemik greftleri osteokondüktif özelliktedir (Oryan ve ark., 2014). Bulaşıcı hastalıklardan ve alerjilerden kaçınmak için hidroksiapatit yapısının değiştirilebileceği yüksek sıcaklıklardaki işlemlere tabi tutulurlar (Cypher ve Grossman, 1996; Jensen ve ark., 2006; Tauro ve ark., 1991).

2019 yılında yayınlanan bir sistematik derlemede, en çok tercih edilen ve en sık kullanılan hayvansal greft materyalinin Bio-Oss® *(Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)* kemik grefti olduğu ve altın standart olarak kabul edilen otogreftlerle karşılaştırıldığında ümit verici sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir (Shamsoddin ve ark., 2019). Aynı makalede, osteokondüktif özellikleri, yeterli miktarda yeni kemik oluşumu, yüksek rezorpsiyon direnci ve yeniden şekillenme sırasında doğal rezorbsiyonu kompanse edebiliyor olması önemli özellikleri olarak sıralanmıştır (Schlegel ve Donath, 1998). Bio-Oss®'un,sinüs ogmentasyonu (Valentini ve ark., 1998), periodontal defektlerin tedavisi (Camelo ve ark., 1998) ve çekim soketinin korunması operasyonlarında tercih edildiği gösterilmiştir (Araújo ve ark., 2008).

Schlegel ve arkadaşları, günümüzde en sık kullanılan ksenojenik kemik greftlerinden biri olan, Bio-Oss® ve otojen kemik kullanarak greftlerdeki değişimleri iki boyutlu olarak incelemek amacıyla beagle köpeklerinde yapmış oldukları maksiller sinüs ogmentasyonu sonrası, mandibuladan alınan kemik greftinde 90 gün sonunda %4, 180 gün sonunda ise %40 rezorbsiyon görülürken; Bio-Oss® kemik greftinde 90 gün sonunda %15, 180 gün sonunda ise %17 oranında rezorbsiyon görülmüştür (Schlegel ve ark., 2003).

Felice ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları randomize kontrollü çalışmada (RCT) ise farklı iki hasta grubunda ilyak krest ve sığır kaynaklı ksenojenik kemik grefti kullanılmıştır. İyileşme sonrası rezidüel greft miktarı ksenogreft grubunda önemli ölçüde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ksenogreftin otojen greft

üzerindeki ana avantajının ikinci bir cerrrahi sahaya gerek duyulmaması ve daha az invaziv olması olarak bildirilmiştir (Felice ve ark., 2009).

Alloplastik kemik greftleri (Sentetik materyaller)

Sentetik kemil greftleri, istenilen zaman temin edilebilme ve neredeyse sınırsız malzemeye sahip olma gibi birçok avantajın yanı sıra, laboratuvar koşullarında elde edilen greft materyalleridir ancak alloplastik biyomateryaller tek başına iyi sonuç vermedikleri için sitokinler ve büyüme faktörleri gibi hücre bileşenleriyle kombine olarak kullanılmışlardır (Bozkaya, 2005; Stark ve Tanczos, 1998; Thomson ve ark., 1999).

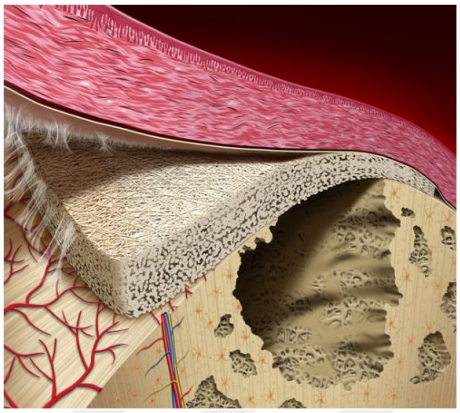
Alloplastik greftler; yüzey yapısına, fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve bileşenlerine göre farklılık gösterebilir. (Zhang ve Ma, 1999; Burg ve ark., 2000; Campoccia ve ark., 2003). Aynı zamanda rezorbe olabilen ve rezorbe olmayan olarak da sınıflandırılabilirler. Sentetik kemik greftlerine örnek olarak; biyoaktif camlar, polimerler, kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat, kalsiyum sülfat sayılabilir (Titsinides ve ark., 2019).

4.3. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu

4.3.1. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tanımı ve tarihçesi

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, Melcher tarafından 1976 yılında periodontal defektlerin tedavisi amacıyla yeni bir konsept olarak ortaya atılmıştır (Melcher, 1976). Dahlin ve arkadaşları ise 1988 yılında YKR'yi ilk kez alveolar kret defektlerinin tedavisi için kullanmış ve tanımlamışlardır (Dahlin ve ark., 1988). YKR'nin temel prensipleri birçok araştırmacı tarafından kapsamlı bir şekilde raporlanmıştır. (Linde ve ark., 1993; Hammerle ve Jung, 2003). Alveolar kret defektlerinin ogmentasyonu için uzun dönem prognozu iyi olan çok yönlü ve etkili bir tekniktir. YKR'de bariyer membranlar kullanılarak, hızlı bir şekilde prolifere olan epitel ve bağ dokusu hücrelerinin defekt bölgesine proliferasyonu engellenerek, daha

yavaş prolifere ve organize olan osteojenik hücrelerin bölgeye göçü sağlanır ve yeni kemik oluşumu uyarılır (Rakhmatia ve ark., 2013).



Şekil 1. YKR ilkesinin şematik gösterimi (Elgali ve ark., 2017).

Literatürde yer alan birkaç çalışma, YKR' nin uzun vadeli iyi bir prognoz ile hem dikey hem de yatay olarak >5,0 mm kemik ogmentasyonu sağlayabildiğini göstermiştir (Simion ve ark., 1994; Simion ve ark., 1998; Simion ve ark., 2004; Tinti ve ark., 1996; Buser ve ark., 1990; Buser ve ark., 1996). Son zamanlarda, YKR 'nin ciddi defektlerde veya ortalama 10 mm vertikal defekte sahip alveolar kemik atrofisinde ortalama >8,5 mm yükseklikte alveolar kemik ogmentasyonu sağladığı bildirilmiştir (Funato ve ark., 2013).

4.3.2. Teknik ve önemli hususlar

Endikasyonlar;

- Fenestrasyon ve dehisens defektleri,
- Yatay kemik defektleri,
- Dikey kemik defektleri,
- Kombine kemik defektleri,

- 2-3 duvarlı ve çevresel periimplantitis defektleri,
- İmmediyat implantasyonlu veya iki aşamalı implant cerrahisi planlanan çekim soketlerinde uygulanabilmektedir.

Kontraendikasyonlar;

- Sigara içen hastalar,
- Kontrol altında olmayan sistemik hastalık varlığı,
- Kötü ağız hijyeni,
- Hastanın tedaviyi kabul etmemesi,
- Cerrahi bölgenin primer olarak kapatılamayacağı durumlar,
- Cerrahi sırasında kemik greftinin veya membranın stabilizasyonunun sağlanamayacağı durumlar,
- Cerrahın yeterli tecrübesi olmadığı durumlardır (I. A. Urban ve Monje, 2019).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda defekt bölgesine, otojen kemikle birlikte allojenik, alloplastik veya ksenojenik kemik grefti (1:1) oranında karıştırılıp uygulandıktan sonra yumuşak dokuyla greft arasına stabil olacak şekilde bariyer membran yerleştirilir. Kullanılan bariyer membran, greftin stabilizasyonu sağlar. Greftin stabilizasyonu sağlanamaz ise hareketliliği veya üzerindeki baskı sebebiyle greft bölgesine giden vasküler beslenme kolayca bozulabilir ve bunun sonucunda iyileşme bağ dokusu ve fibröz kapsül oluşumu ile meydana gelir. Kemik rejenerasyonu bu sebepten ötürü başarısız olabilmektedir (Elgali ve ark., 2017).

2006 yılında Wang ve arkadaşları, kemik rejenerasyonunda başarı için ‘’***PASS***’’ prensibini öne sürmüşlerdir;

(1) Yumuşak doku (Flap), doğru insizyon dizaynıyla gerilimsiz kapatılabilir ve iyileşme potansiyeli artırılır.

(2) Alıcı sahada dekortikasyon gerçekleştirilerek yeni damar oluşumu uyarılır ve böylece greftin beslenmesi ve oksijenlenmesi artırılmış olur.

(3) Membran, greftin yerleştirilebileceği bir boşluk oluşturacak şekilde konumlandırılır ve greftin çökmesini ve dağılmasını engeller.

(4) Pıhtı stabilizasyonu sağlanarak yara iyileşmesi hızlandırılır (Wang ve Boyapati, 2006).

İmplant tedavisi planlanan hastaların %40’ında kemik defektinin rehabilitasyonu amacıyla YKR’ye ihtiyaç duyulmaktadır (Bornstein ve ark., 2008). Literatürde yapılmış olan birçok çalışma, YKR ile ogmente edilmiş kemiğe yerleştirilen implantların sağ kalım oranların, defekt bulunmayan sağlıklı kemiğe yerleştirilen implantlarla benzer olduğunu göstermiştir (Donos ve ark., 2008; Clementini ve ark., 2012; Ikezoe ve ark., 1998). Ogmentasyon gerçekleştirilmiş bölgeye yerleştirilen implantların sağ kalım oranları %79 ile %100 arasında değişmektedir ve çalışmaların çoğu en az bir yıllık fonksiyondan sonra hayatta kalma oranının %90’ın üzerinde olduğunu göstermektedir **(**Hämmerle ve ark., 2002).

4.3.3. Bariyer membranlar

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kullanılan bariyer membran, tedavinin önemli bir bileşenidir. Tarih boyunca farklı membran türleri bu amaçla kullanılmıştır (Elgali ve ark., 2017). Bariyer membranların ilk kullanımı 1980’li yıllarda başlamıştır. İlk olarak emilebilir olmayan politetrafloroetilen (PTFE), nanopolitetrafloroetilen, genişletilmiş-PTFE (e-PTFE) ve yoğun (d-PTFE) membranlar uygulanmaya başlanmıştır ancak membranın ikinci bir cerrahiyle

çıkarılması gerekliliği ve erken dönemde karşılaşılan yüksek dehisens olasılığı gibi dezavantajları sebebiyle biyolojik olarak daha uyumlu materyallerin arayışına girişilmiştir. Bariyer membranların sahip olması gereken belli başlı özellikler vardır; biyouyumlu olmalı, hücre migrasyonunu engellemeli, çevre dokulara entegre olmalı, yeterli fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olmalı, klinik manipülasyonu kolay olmalı, greft materyalinin stabilizasyonu ve osteojenik hücrelerin defekt bölgesine göçü için yeterli boşluğu oluşturmalıdır (Elgali ve ark., 2017; Urban ve ark., 2017).

Günümüzde kolajen, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL), kitosan ve bunların kopolimerleri gibi emilebilir olan çeşitli membranlar kullanılmaktadır. Özellikle kolajen membranlar yüksek gerilme direnci, düşük uzama kabiliyeti, kontrollü çapraz bağlanma özelliği, düşük antijenitesi, yara iyileşmesi ve pıhtılaşma üzerinde olumlu etkileri olan membranlardır. Bu sebeplerden YKR'de daha çok tercih edilirler (I. A. Urban ve Monje, 2019).

Sentetik polimer membranlar *(PTFE)*

Biyolojik dokulara karşı inert ve stabil bir yapıya sahip olmasının yanı sıra; rezorbe olmadıkları için yabancı cisim reaksiyonu ve yumuşak doku dehisenslerine sebep olabilir.

Alifatik polyester membranlar *(PLA, PGA, PCL)*

Rezorbe olabilir ve klinik manipülasyonu kolaydır ancak dokuda zayıf stabilite ve dayanıklılık gösterir.

Doğal polimer membranlar *(Kolajen, kitosan, aljinat)*

Rezorbe olabilme, düşük immünojenite ve ilaç kapsülleme yeteneğine sahip olması önemli avantajlarındandır ancak boyutsal stabilitesi PTFE ve metal yapılı membranlara göre daha zayıftır.

Metal yapılı membranlar *(Titanyum ve titanyum alaşım, kobalt-krom alaşım)*

Yüksek boyutsal stabilite ve dayanıklılığa sahiptir ancak rezorbe olmaz, yabancı cisim reaksiyonuna ve yumuşak doku dehisenslerine sebep olabilir.

İnorganik bileşiklere sahip membranlar *(Kalsiyum sülfat, kalsiyum fosfat)*

Rezorbe olması ve osteokondüktif özelliklerinin yanında; düşük dayanıklılık ve boyutsal stabilitesinin yetersiz olması gibi önemli dezavantajlara sahiptir (Elgali ve ark., 2017).

4.4. Hidrojeller

Hidrojeller sentetik ve doğal polimerlerle çeşitli kimyasal veya fiziksel çapraz bağlayıcıların bir araya getirilmesiyle sentezlenen, üç boyutlu polimer bazlı yapılar olup yüksek biyolojik sıvı ve su tutma kapasiteleriyle medikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen biyomalzemelerdir. Sıvı absorplama karakteri dışında hidrojellerin pH ve sıcaklığa duyarlı malzemeler olması ve kurutulduktan sonra tekrar şişme gibi özellikleri sebebiyle; son yıllarda doku mühendisliği, ilaç salım sistemleri, tanı ve optik araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hidroksietil metakrilat (HEMA), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), N-vinil-2- pirolidon (NVP) sentetik ve chitosan, aljinat, kolajen, selüloz, hyalüronik asit (HA), levan, dekstran ve jelatin ise bu malzemelerin sentezinde sıklıkla kullanılan doğal polimerlere örnektir.

Geliştirilen hidrojeller; ortama duyarlı, kendiliğinden iyileşebilme ve birleşme, şekil hafızalı olmalarına göre kategorize edilmiş ve ön plana çıkarılmıştır. Bu akıllı malzemeler ışık, manyetik alan veya sıcaklık gibi faktörlerle ya da herhangi bir uyarıcıya gerek duymadan tekrar eski formuna gelebilir. Elastik hidrojeller şekil hafızaları sayesinde, yapışkan hidrojeller ise yara üzerine tutunup daha sonra ağrısız bir şekilde uzaklaştırılabildikleri için sıklıkla yara örtüsü olarak kullanılmalarına ek

ilaç salım sistemleri, tanı ve optik araştırmalarda da sıklıkla tercih edilmektedirler (Mahinroosta ve ark., 2018; Calo ve ark.,2018; Choundhury ve ark., 2018, Hamedi ve ark., 2018).

Günümüzde hidrojeller ticari ürün olarak da bulunmaktadır. MySkin® bu ürünlerden biridir ve direkt olarak yaranın üzerine uygulanabilme özelliği vardır (Mishra ve ark., 2018). Enjekte edilebilir hidrojeller son on yılda doku mühendisliği uygulamaları için umut verici biyomalzemeler olarak, örneğin biyouyumlu ve biyobozunur yapıları nedeniyle hücre veya biyoaktif faktör dağıtımı için taşıyıcılar olarak ortaya çıkmıştır (Mantha ve ark., 2019; Anamizu ve Tabata, 2019). Hidrojellerin en belirgin özelliklerinden biri, lifli yapısal proteinlerden (kolajen) ve polisakkaritlerden (hyaluronik asit) oluşan karmaşık bir üç boyutlu ağ olan doğal hücre dışı matrisin (ECM) mimarisini ve bileşimini taklit etme yetenekleridir (Hernández-González ve ark., 2020). Bu ağ içinde kolajen, kapsüllenmiş hücreleri çekme ve kesme stresinden korurken polisakkaritler, hücreleri sıkıştırma kuvvetlerinden koruyan su emici bileşenlerdir (Ma ve ark., 2018; Huang ve ark., 2017). Yerinde jelleşme özellikleri sayesinde enjekte edilebilir hidrojeller, minimal invaziv enjeksiyon yoluyla düzensiz boyutlu defektleri doldurmak, doku defektleri ile sorunsuz bir şekilde bütünleşmek ve yerinde kemik iyileşmesini desteklemek için kullanılabilir (Mantha ve ark., 2019; Hernández-González ve ark., 2020).

De novo kemik oluşumu, progenitör veya farklılaşmış hücrelerin alınmasına, transplantasyonuna, hedeflenmesine veya modülasyonuna dayanır. Bu hücreler, yeterli biyomekanik özelliklere sahip olgun bir dokuya yol açan kontrollü bir şekilde yapışarak, çoğalarak ve farklılaşarak biyolojik işlevlerini yerine getirmek için yeterli bir substratın mevcudiyetini gerektirir (Burg ve ark., 2000).

Piyasada en yaygın olarak bulunan hidrojel içeriği HA, minimal yara izi bırakma, cilde esneklik verme ve nemlendirme özellikleri sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak HA ve kolajen gibi polimerlerin elde edilme zorlukları ve yüksek maliyetleri sebebiyle mikrobiyal polimerler ile oluşturulan hidrojeller ön plana çıkmış ve bu polisakkaritlere iyi bir alternatif oluşturmuştur. Örneğin pullulan

hidrojelleri yara dokusundaki dehidrasyonu engellemiş ve yüksek sıvı absorbe etme özelliği sayesinde antibakteriyel ilaçlarla yüklenmiş ve mikrobiyal biyofilm oluşumunu engellemiştir (Gurtner ve ark.,2017; Xu ve ark., 2018). Levan polimeri ise biyouyumlu, yapışkan ve uygun maliyetli olması nedeniyle hidrojel sentezinde kullanılmıştır (Dermici ve ark., 2020; Selvi ve ark., 2021).

4.4.1. Halomonas levan

4.4.1.1. Ön bilgiler

Doğal polisakkaritler kökenleri, anti-oksidan, anti-inflamatuar, yara iyileştirici, hücre göçünü yönlendirici ve hücre bölünmesini indükleyici, doğal büyüme faktörlerini taklit edici etkileri, düşük immün yanıt oluşturma ve düşük toksisite gibi biyoaktiviteleri sebebiyle sentetik materyallere göre daha üstündür. Bitki, deniz, hayvan ve bakteriyel kaynaklı çeşitli doğal polisakkaritler mevcuttur. Yüksek ölçekli, kontrollü üretim ve saflaştırma avantajları ile biyoaktiviteleri ve düşük immun yanıt oluşturma özellikleri göz önüne alındığında bakteriyel kaynaklı polisakkaritler diğerlerine üstünlük sağlamakta ve başlıca tıp ve sağlık alanı olmak üzere birçok alanda önemli çalışmalarda tercih edilmektedir. Levan, pullulan, kurdlan ve bakteriyel selülöz sıklıkla kullanılan doğal polisakkaritlere örnek olarak verilebilmektedir (Demirci ve ark., 2020). Levan, β (2-6) bağlı, doğada en yaygın bulunan fruktan polimeridir. Güçlü doku adezivliği, düşük iç viskozitesi ve yüksek biyouyumluluk ve su tutma kapasitesi gibi üstün fonksiyonel ve yapısal özellikleriyle diğer doğal polimerlerden ayrılmıştır. Bunlara ek olarak antioksidan, prebiyotik ve hipoglisemik karakteristikleri sayesinde ilaç, gıda, kozmetik, kimya ve diğer endüstrilerdeki çeşitli uygulamalarda kendine yer bulmuştur (Öner ve ark., 2016).

4.4.1.2. Levan polisakkaritinin sentezi ve içeriği

Doğada fruktanlar, sınırlı sayıda bitki türü ve arkeler, mantarlar ve çok çeşitli bakterileri içeren birçok mikroorganizma tarafından sukrozdan sentezlenir. Bitkiler, her biri kendi tercihli verici ve alıcı substratlarına sahip olan çeşitli fruktosiltransferazların uyumlu eylemiyle vakuolde fruktanları sentezler.

Sükroz:fruktan 6-fruktosiltransferaz (6-SFT; EC 2.4.1.10), alıcı substrat olarak bir fruktan molekülü veya sükroz kullanma çift yeteneği ile sakaroz:sukroz 6-fruktosiltransferaz (6-SST) olarak da bilinir ve bitki fruktanlarında β(2-6) fruktosil-fruktoz bağlarının oluşumundan sorumludur. Tek başına 6-SFT, lineer levan zincirlerini, trisakarit ara ürünü 6-kestoz aracılığıyla doğrudan sakarozdan sentezler. Bu enzimin diğer doğal fruktosil alıcıları, 1-kestoz ve 6G-kestotriozdur (Lasseur ve ark., 2011). Bitki fruktanları genellikle düşük bir polimerizasyon derecesine sahiptir (DP <101 ila 102). Bakteriyel inülin ve levan çok daha yüksek moleküler kütlelere (103 ila >104 fruktosil birimi) ulaşır ve daha geniş bir biyoteknolojik uygulama yelpazesi sunar (Öner ve ark., 2016). Bakteriyel fruktosiltransferazlar, sakarozu [a-D-glukopiranozil-(1,2)-β-D-fruktofuranosid] doğrudan yüksek düzeyde polimerize fruktanlara dönüştürebilen çok işlevli enzimlerdir. Enzim, inülini sentezlediğinde inulosucrase (EC 2.4.1.9), polimerizasyon ürünü levan olması halinde levansükraz (EC 2.4.1.10) olarak adlandırılır. Levansükrazlar ayrıca inulin tipi fruktooligosakkaritleri (FOS) sentezlemek veya polimerin β-(2,6) bağlantılı zincirlerini bağlayan dallanma noktaları oluşturmak için β-(2,1) fruktosil-fruktoz bağlantıları oluşturabilir. İnülosukrazın varlığı sadece gram pozitif bakterilerde, özellikle ek olarak levansükraz içerebilen üç cinsten (Streptococcus, Leuconostoc ve Lactobacillus) türlerde bildirilmiştir (Olvera ve ark., 2007; Anwar ve ark., 2010). Levansükraz oluşumu gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde oldukça yaygındır.

Levan, doğada en yaygın bulunan (2 → 6)-bağlı fruktoz monomerlerinden oluşan bir fruktan polimeridir. Bu suda çözünür, toksik olmayan, güçlü yapışkan ve film oluşturucu polimer tıp, gıda, ilaç, kozmetik ve kimya endüstrilerindeki birçok uygulama ile ilişkilidir (Kang ve ark., 2009). Levan, ilk ekstremofilik levan üreticisi halofilik bakteri Halomonas smyrnensis AAD6T'yi de içeren çeşitli mikrobiyal türler tarafından sukroz bazlı substratlardan hücre dışı olarak üretilir (Kazak Sarilmiser ve ark., 2015; Poli ve ark., 2009; Poli ve ark., 2013).

Levan polisakkariti, kültür ortamında yetiştirilmiş mikroorganizmalar veya izole edilmiş enzim tarafından ortamda sukroz, melas vb varlığında sentezlenir. Üretim koşullarının neden olduğu bazı değişkenliklerle birlikte, levansükrazın mikrobiyal kaynağı, polimerin moleküler ağırlığı, dallanma derecesi, içsel viskozitesi, stabilitesi, immünojenik aktivitesi ve adezyon özelliği farklılık gösterebilmektedir (Jakob ve ark., 2013; Runyon ve ark., 2014).

4.4.1.3. Levan polisakkaritinin fiziksel ve biyokimyasal özellikleri

Uzun fruktan zincirlerinden oluşan polimer, tadı nötrdür ve kokusuzdur. Hidrofilik ve lipofilik özellik gösterir; aside, alkaliye, ısıya oldukça dirençli ve stabildir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikler içermesi levanın solüsyonlarında nano boyutta tanecikler halinde bulunmasını sağlar. Birçok polimerin aksine levan, suda şişmez. Ayrıca tuzlar ve yüzey aktif maddelerle uyumlu, su ve kimyasal tutma kapasitesine sahiptir ve film oluşturabilmektedir. Viskozitesinin düşük olması, tat ve renk düzenleyici özellikleri sayesinde kapsül ve tablet yapımı gibi birçok farmakolojik uygulamada adından söz ettirmektedir. İlaç tabletlerinde ve kaplamalarında renk ve tat düzenleyici etkileri sebebiyle tercih edilmektedir.

Levanın deri dokusunda antienflamatuvar ve yumuşatıcı etkisinin olduğu bilinmektedir Hücre onarımı özelliklerinin yanı sıra, enfeksiyon ve nekroza karşı dokuyu koruma özelliği de vardır (Esawy ve ark., 2011).

Diyabetli sıçanlarda içme suyuna eklenmesi sonucunda levanın, plazma glukoz seviyesini düşürdüğü ve glikojen seviyesini yükselttiği görülmüştür (Dahech ve ark., 2011). Levanın aynı zamanda böbrek, pankreas, karaciğer ve kalpte süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini yükselttiğine dair çalışmalar mevcuttur. Levan, beslenme ile alınması durumunda katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitesini artırarak antioksidan etki gösterir ve hayati organlar için koruyucu görev üstlenir (Belghith ve ark., 2012).

Asetillenmiş, bezillenmiş ya da fosforlanmış levan türevleri daha yüksek indirgen aktivite göstermekte, hidroksil ve süper oksit radikallerini daha etkili tutmaktadır.

Levan;, antienflamatuar ve anti-kolesterol özelliklere sahip olduğundan sağlık alanında oldukça tercih edilen bir biyomateryaldir. Tümörlü hücrelerin hücre zarı geçirgenliklerini arttırıp sitotoksik ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmelerini sağlayarak tümör inhibisyonu sağlar. Ayrıca antikoagülan ajan olarak da kullanılmaktadır (Srikanth ve ark., 2015). Toksik olmayan ve mutajenik aktivitesi bulunmayan bu polimer biyobozunur özelliğe sahiptir, iyi bir oksijen bariyeridir, organik çözücülere dirençlidir ve kurutulmuş granül formunda uzun süre depolanabilir. Oksitlenmiş levan çevresinde hücresel proliferasyonun çok yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (Axente ve ark., 2014; Sima ve ark., 2011). Hasarlı doku iyileşmesinin anahtar adımlarından biri olan, metalloproteinaz aktivasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (Sturzoiu ve ark., 2011).

Fizikokimyasal özellikleri sayesinde levan, hidrojel üretimi için ideal bir polimer olarak görülse de son yıllara kadar levan bazlı hidrojeller üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. İlk olarak bir çalışmada *Bacillus subtilis* kaynaklı metakrilatlanmış levan türevlerinden foto-çapraz bağlama yöntemi ile çeşitli hidrojeller üretilmiş ve jellerin mekanik özellikleri, biyobozunurlukları ve biyouyumlulukları, levan hidrojellerinin yeni bir tür fonksiyonel biyomalzeme olma potansiyeli gösterdiğini ortaya koymuştur (Berg ve ark., 2018). *Erwinia amylovora* kaynaklı levanın jel oluşturma özelliğinin, levan mikro hidrojellerinin gıda, tıp ve kozmetik uygulamalarda kullanılmasına olanak sağladığı ise bir başka çalışmada öne sürülmüştür (Peng ve ark., 2019). Yeni yayınlanan bir çalışmada farmasötik bir yardımcı madde olarak *Bacillus licheniformis* levanın yapısal, fonksiyonel ve kontrollü salım özellikleri incelenmiş ve hem anyonik hem de iyonik olmayan emülsifiye edicilerle uyumlu bir ko-stabilizatör özelliği gösterdiği ve dolayısı ile topikal ilaçlarda kullanım potansiyelinin yüksek olduğu ortaya konmuştur (Pantelić ve ark., 2020).

4.4.1.4. Levan polisakkaritinin etki mekanizması

Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü IBSB araştırma grubu 2008 yılından bu yana *Halomonas smyrnensis* halofilik bakterisi tarafından üretilen HL'nin farklı kullanım alanları üzerine yoğunlaşmıştır. HL üzerinde yapılan çalışmalar bu materyalin, antioksidan, heparin mimetik (Erginer ve ark., 2016) ve antikanser (Kazak Sarilmiser ve Toksoy Oner, 2014) aktiviteler sergilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca lazerle desteklenmiş nanoyapılı biyoaktif yüzeyler (Axente ve ark., 2014), yapışkan ve çok tabakalı film yapısı (Costa ve ark., 2013) ile sıcağa duyarlı hidrojeller (Osman ve ark., 2017) ve doku mühendisliği uygulamaları (Avsar ve ark., 2018; Sezer ve ark., 2015) gibi birçok değerli alanda fonksiyonel materyal olarak kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Araştırma ekibinin levan temelli BDDE ile çapraz bağlı hidrojeller ve bu jellerin *in-vitro* biyouyumluluk araştırmaları konusunda bilgi birikimi ve tecrübesi mevcuttur. 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada Osman ve ark. HL polimerini poli N-izopropil akrilamid (pNIPA) polimer ağı için bir çapraz bağlayıcı olarak kullanmış ve kontrollü 5-aminosalisilik asit (5-ASA) salımını başarıyla gerçekleştiren uyarıya hassas hidrojeller elde etmişlerdir (Osman ve ark., 2017). Daha yakın bir zamanda ise ilk HL bazlı hidrojeller BDDE çapraz bağlayıcısı ile elde edilmiş ve dermal lokal antifungal terapi için kontrollü amfoterisin B salımı sağlanmıştır (Demirci ve ark., 2020). Yine aynı ekip tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise molekül ağırlığı düşürülmüş HL polimerinin ve fosfonatlanmış kimyasal modifiye versiyonunun farklı sıcaklık ve pH'larda şişme, resveratrol salınımı, fibroblast hücre proliferasyonunu destekleyici etkileri ve sentezlenmiş hidrojellerin reolojik özellikleri incelenmiştir (Selvi ve ark., 2021). Levan bazlı hidrojellerin biyomedikal ve farmasötik uygulamalardaki potansiyellerinin uygulamaya dökülebilmesi için daha çok sistematik ve *in-vivo* çalışmaya ihtiyaç vardır.

4.5. *İn Vitro, İn Vivo* Çalışmalar ve Hayvan Modelleri

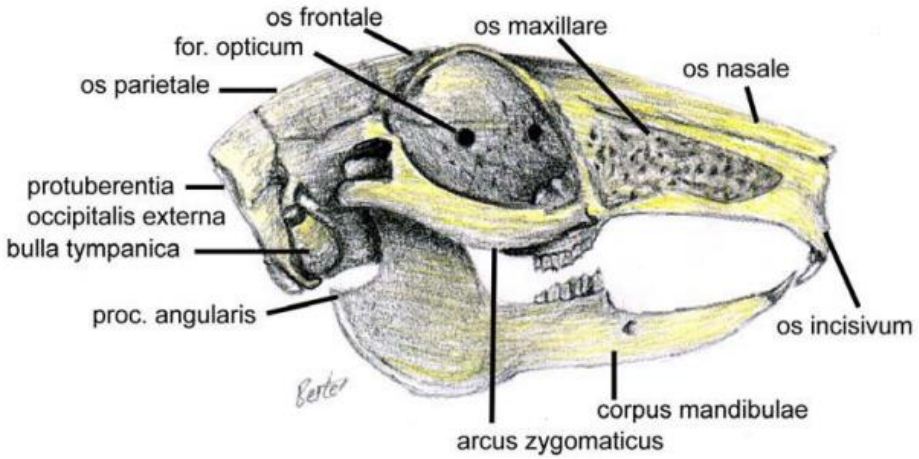
Biyomalzemelerin *in vitro* değerlendirmesi, *in vitro* ortamın azaltılmış karmaşıklığından kaynaklanan belirli sınırlamalara tabidir; *in vivo* implantasyondan kaynaklanan aynı olaylar dizisinin yokluğuna ek olarak *in vitro* çalışmalarda, yara iyileşme sürecinde görülen hiçbir immün veya inflamatuar yanıt yoktur; örneğin kan bileşenleriyle etkileşim, bir pıhtı oluşumu, damarlanma ve çeşitli hücrelerin toplanması görülmez (Ratner ve ark., 2017). Ayrıca *in vitro* çalışmalar genellikle doku ve organların 3 boyutlu ortamına benzemeyen 2 boyutlu (düzlemsel veya eğri yüzeylerde) yürütülür. Bu nedenle, biyomalzemelerin *in vitro* değerlendirilmesi şüpheli klinik öneme sahiptir. Bununla birlikte, implantların gelecekteki *in vivo* entegrasyonunu daha iyi anlamak ve biyomalzemeler arasında bir başlangıç karşılaştırması sağlamak amacıyla *in vitro* çalışmalar sıklıkla *in vivo* çalışmalardan önce yapılır.

Hayvan modelleri ile *in vivo* araştırma, yaklaşık olarak, daha etkili klinik tedaviler oluşturmak için kullanılabilecek fizyolojik ve patolojik koşullarla ilgili verileri sağladığı için tercih edilen bir yöntem olmuştur. *İn vivo* araştırma, *in vitro* çalışmalar ve klinik deneyler arasında bir bağlantı kurar. Deneysel hayvan modelleri, gerçek ortamlara yeterli bir yaklaşım sağlamak için gereklidir. Buna göre, uygun tasarım ve modelin seçimi, en sonunda, test edilen terapötik modaliteye bağlıdır (Muschler ve ark., 2010).

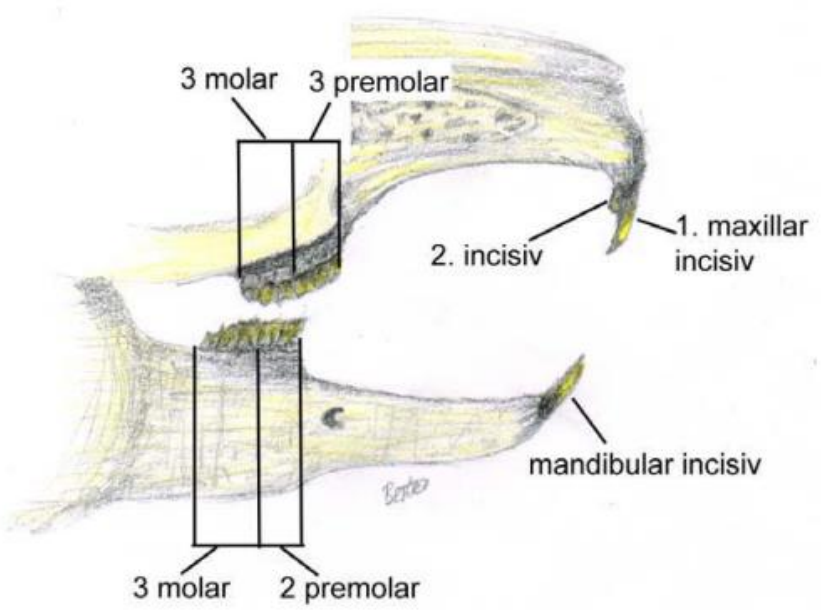
In vivo hayvan modelleri, uzun süreler için, farklı doku kalitelerinde (normal sağlıklı veya osteopenik kemik) ve yaşlar gibi farklı yükleme koşulları altında biyomalzemelerin değerlendirilmesine olanak tanır. Test modeli olarak belirli bir hayvan türünün seçilmesi sırasında birkaç faktör dikkate alınmalıdır; en önemlisi seçilen hayvan modeli insanlara fizyolojik ve patofizyolojik benzerlikler göstermelidir; nispeten kısa bir süre boyunca ameliyat sonrası kontrol edilebilir operasyon ve çeşitli test kriterlerinin gözlemlenmesi; implant boyutu, hayvan başına implant sayısı ve test süresi uluslararası standartlara uygun olmalıdır. Diğer seçim kriterleri, edinme ve bakım maliyetlerini, hayvan mevcudiyetini, sosyal kabul

edilebilirliği, hayvanın testlere dayanma kabiliyetini ve barınma kolaylığını içerir (Li ve ark., 2015).

İmplant diş hekimliğinde kullanılan laboratuvar tavşanları (Oryctolagus cuniculus), Lagomorpha takımının Leporidae familyasına aittir. İki yaşayan aile vardır: Leporidae (tavşanlar) ve Ochotonidae (pikas). Lagomorpha iki çift üst kesici dişe sahiptir, bunun üzerine ikinci çift doğrudan birincisinin arkasında bulunur ve daha küçüktür. Dişlerin bu ayırt edici özelliği, Lagomorpha'yı kemirgenlerden ayırır ve onları ayrı bir düzen olarak sınıflandırır. Amerikan Tavşan Yetiştiricileri Birliği şu anda 47 tanınmış benzersiz tavşan ırkı tayin etmektedir. Bu ırkların birçoğunda, hayvanlar geniş bir çeşitlilik ve çeşitli farklılıklar ve varyasyonlar (ör. tüy ve göz rengi) gösterir (http://www.arba.net, 2011).



Şekil 2a. Tavşanda kafa kemikleri ve mandibulanın lateralden görünümü (Aspinal ve O'Reilly, 2004).



Şekil 2b. Tavşanda dişlerin şematik gösterimi (Aspinal ve O'Reilly, 2004).
.



Resim 1. Tavşanda insiziv malokluzyon (Aspinal ve O'Reilly, 2004).

Genel olarak, tavşanların bireysel sınıflandırmasından postun tipi ve rengi sorumludur. Laboratuar hayvan biliminde esas olarak en büyük soy, Flaman Devidir (9 kg ve üzeri). Hollanda kuşaklı (1-2 kg), Yeni Zelanda Beyazı (5-6 kg) ve İsveç Döngüsü (4-5 kg) kullanılmıştır (Brewer , 2006). Yeni Zelanda Beyaz Tavşanından, özellikle ateroskleroz araştırmaları için lipid metabolizmasında genetik değişiklikler olan genetiği değiştirilmiş suşlar tanıtılmıştır (Yanni, 2004).



Resim 2. Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı (YZBT) bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan tavşan türüdür (Yanni, 2004).

Oral ve maksillofasiyal cerrahide, bilim adamları çoğunlukla geleneksel veya özelleştirilmiş implantları belirli bir uzunlukta yerleştirmek için yeterli kemik hacmi sunan büyük boy hayvanları tercih ederler. En yaygın deneysel modeller tavşanın arka bacağına ve kafatasına uygulanır. Diğer anatomik bölgeler ve cerrahi teknikler oldukça azdır. Dental implantların altında katı, partikül, sıvı, enjekte edilebilir veya esnek, biyobozunur biyomalzemelerin uygulanması ve değerlendirilmesi yapılır (Stübinger ve Dard, 2013).

Kemikteki implantların ve biyomateryallerin test edilmesi için uygun türlerle ilgili uluslararası standartlara göre tavşanlar önemli bir türü temsil etmektedir. Sıçan en sık kullanılan modellerden biri olmasına rağmen, kemik bileşimi, iyileşmesi ve anatomisindeki önemli farklılıklar nedeniyle diş implantları ve kemik rejenerasyonunun test edilmesi için gerçekten uygun bir model olarak görülmemektedir (Pearce ve ark., 2007). Tavşanın önemli bir avantajı, erken iskelet olgunluğu ve uzun kemiklerin ve yassı kemiklerin gövdesinde var olan yaklaşık %70-80 kompakt kemik oranıdır (Gilsanz ve ark., 1988).

Kalvaryal defekt modeli, iyi çalışılmış ve uygun bir modeldir çünkü ; (1) Kalvaryal kemik, uygun radyolojik ve histolojik analize olanak sağlayan tek tip dairesel bir defektin oluşturulmasına izin veren plaka benzeri bir yapıdır (Greenwald ve ark., 2001), (2) Kalvaryal kemik, daha kolay cerrahi prosedürler ve biyomateryal kullanımı için iyi bir boyuta sahiptir (Witteveen ve ark., 1976), (3) Dura ve üstteki deri tarafından sağlanan destek nedeniyle fiksasyon gerekmez, (Cypher ve Grossman, 1996), (4) Model iyi çalışılmıştır, kolayca tekrarlanabilir ve çeşitli maddelerinin kesin olarak karşılaştırılmasına izin verir (Giannoudis ve ark., 2005), (5) Nispeten ekonomik bir modeldir (Katz, 1954).

Biyomateryal testinin ilk aşamasında, tavşanlar genellikle önerilen yapının tüm potansiyel bileşenlerini ve sistemik etkilerini araştırmak için kullanılır, çünkü tavşanların çok çeşitli hücreleri, serumları, doku yapıları ve organları insanlarla neredeyse benzerlik gösterir (Fox, 1984). Sonuç olarak, tavşanlar boyutları, kolay kullanımları, kısa ömürleri ve satın alma ve sürdürmedeki ekonomik yönleri nedeniyle temel implant tasarım çalışmaları için ilk elden bir seçim olarak görünmektedir.

Seçilen kemik defekti modeli, ideal olarak amaçlanan klinik uygulamanın bir kopyası veya iyi bir temsili olmalıdır. Olası kemik defekti modelleri arasında kalvarial, uzun kemik veya maksillofasiyal defektler yer almaktadır. Bu modeller, sırasıyla osteouyumluluk ve osteogenezi test etmek için kritik olmayan ve kritik boyutlu kemik defektleri olarak kategorize edilebilir. Kalvarial defekt, kemiğe göre daha

düşük mekanik özelliklere sahip biyomateryalleri araştırmak için yaygın olarak yük taşımayan bir model olarak kullanılır.

Heterotopik uygulamalar sonucu meydana gelen sınırlamaları çözmek, devamlılığı olmayan ve ağırlık taşıyan lezyonların onarımı amacıyla kemik içi defektler kullanılmaktadır ve malzemelerin kapasiteleri test edilmektedir. Kemik araştırmalarında ortotopik modeller olarak; kalvarya, uzun kemik veya mandibula segmental, kısmi kortikal ve süngerimsi kemik defektleri kullanılmaktadır. Kalvaryal model, özellikle kraniyofasiyal defektlerin rejenerasyonunu ifade eden kemik rejenerasyonunu hedefleyen karmaşık materyalleri ve doku mühendisliği yapılarını değerlendirmek için yeterli bir model olarak öne çıkmaktadır. Bu model, fareler, sıçanlar, tavşanlar, köpekler, koyunlar, keçiler, domuzlar dahil olmak üzere çok çeşitli hayvan türlerinde kurulmuştur ancak sıçanlar ve tavşanlar en yaygın kullanılan hayvanlardır (Salgado ve ark., 2004).

Schmitz ve ark., bir hayvanın yaşamı boyunca spontan iyileşme göstermeyen , en küçük boyuttaki kemik defektinin, Kritik Boyut Defekti (KBD) olarak tanımlanabileceğini açıklamışlardır. Buna göre KBD, fizyolojik doku onarımı ve rejenerasyon sürecinin sağlanabileceği eşik değeri geçtiğinden başarısız olmuş, osteogenezin özel bir koşulu olarak devamlılığı bozulmuş defektlerin prototipi olarak düşünülebilir (Schmitz ve Hollinger 1986; Hollinger ve Kleinschmidt, 1990). Farklı çalışmalar tavşanlar için, KBD'nin kalvaryada 15 mm (Hollinger ve ark., 1989), mandibular kemikte 5 mm ve uzun kemiklerde 6 mm olduğunu göstermiştir (Kahnberg, 1979).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Levan Üretimi, Saflaştırılması ve Levan Temelli Hidrojellerin Sentezlenmesi

Tez kapsamında kullanılmış olan levan hidrojellerinin eldesi için öncelikle yüksek saflıkta levan polimeri Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü IBSB Araştırma Laboratuvarlarında üretilmiştir. 2008 yılından beri *Halomonas smyrnensis* AAD6 mikrobiyal kültürleri ile levan üreten ekip, 2018 yılından itibaren bu bakterinin levan biyosentezinden sorumlu levansukraz enziminin *Escherichia coli* sisteminde rekombinant olarak üretilip saflaştırılması ile enzimatik olarak, enzimatik levan (EHL) üretmektedir (Kirtel ve ark., 2018) ve farklı tıp ve biyomedikal uygulamalardaki kullanımı araştırılmaktadır. Kırtel ve ark. (2018) tarafından bahsedildiği gibi üretildikten sonra saflaştırılmış levansukraz enzimi ile levan üretimi kesikli sistemde yaklaşık 18 saat gibi kısa bir sürede tamamlanmıştır. Substrat çözeltisinin bileşiminde 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 5,9) içerisinde ticari sukroz (100 g/L), Çamaltı tuzu (İzmir, Çamaltı Tuzlası'ndan elde edilen ham tuz, 204,5 g/L) ve EDTA (1.5 mM) bulunmaktadır. Saf enzim fraksiyonu toplamda 2 litre hacme sahip substrat çözeltisine eklenmiş ve 15°C'de bir gece karıştırma olmadan inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki gün çözeltinin üzerine hacimce 2,5 katı etanol eklenip, karıştırılmış ve bir gece -20°C'de bekletilerek levanın çökmesi sağlanmıştır. Levan çökeltisi 8,000 x g'de 20 dk santrifüjlenerek ayrılmış ve distile suda çözündürülmüştür. Elde edilen levan çözeltisi; tuzun, sükroz hidrolizi sonucu açığa çıkan glukozun ve diğer küçük moleküllerin uzaklaştırılması için 13 kDa por açıklığına sahip diyaliz membran içerisinde beş gün boyunca distile suya karşı diyaliz edilmiş. Son olarak çözeltiden proteinin uzaklaştırılması için ise DEAE Sepharose CL-6B zayıf anyon değiştirici kolon kullanılmıştır. Elde edilen saf levan çözeltisi konveksiyonel kurutucuda 50°C'de kurutulmuş ve şeffaf bir film halini almasının ardından öğütülüp toz haline getirilmiş olan levan, çalışmamızda kullanılmak üzere hazırlanmıştır (Kirtel ve ark., 2018; Cinan ve ark., 2021).

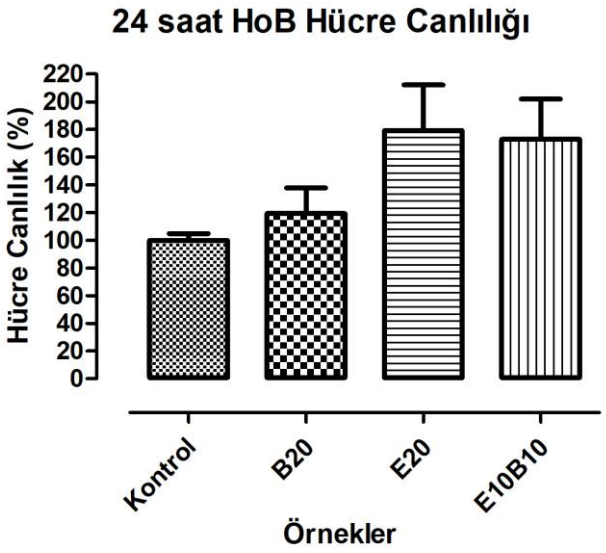
Mikrodalga destekli asit hidrolizi, levanın molekül ağırlığının düşürülmesi için uygulanmış EhL elde edilmiştir (Selvi ve ark., 2021). Bunun için 10 g levan cam şişede 171,5 dH2O içerisinde çözündükten sonra çözeltiye 3,5 ml glasiyel asetik asit eklenmiş ve 30 sn boyunca %60 güç ayarında mikrodalgaya atılmıştır. 10 sn süreyle şişe mikrodalgadan çıkarılıp karıştırılmış ve tekrar 30 sn mikrodalgaya tabi tutulmuştur. EhL bir behere aktarılmıştır ve etanol ile 1 L hacme tamamlanarak -20°C'de bir gece bekletilmiştir, böylece levanın çökmesi sağlanmıştır. Ertesi gün levan çökeltisi 8,000 x g'de 20 dk santrifüj edilerek toplanmış, etanol ile birkaç kez yıkanmış ve vakumlu etüvde 24 saat boyunca kurutulmuştur. Deneylerde kullanılmış olan hidrojellerin sentezi ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi için Selvi ve arkadaşları (2021) tarafından bahsedilen metot uygulanmıştır. EhL polimeri 0,25M NaOH içerisinde çözülmüştür (%7 w/v) ve oda ısısında 20 dakika karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından EhH-NaOH çözeltisi üzerine BDDE ilave edilerek (1:20 (v/v) BDDE: EhHL) 1 saat karıştırılmıştır. Hidrojeller, 12 saat 55 °C su banyosunda bekletilmiş, ardından yıkanarak ve sonrasında liyofilize edilerek kurutulmuştur. Kurutmanın ardından şişme kinetikleri hesaplanmış, karakterizasyonları yapılmıştır (Selvi ve ark., 2021).

Hidrojeller kullanım öncesi toz haline getirilerek UV ile sterilize edilip serum fizyolojik ile şişirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Uygulama esnasında 100 µL serum fizyolojik ile şişirilmiş levan, Bio-Oss® ile (Bio-Oss®: Levan; 4:0, 3:1, 2:2 ve1:3) farklı oranlarda karıştırılarak kalvaryal defektlere uygulanmıştır.

5.2. Levan Hidrojelinin Biyouyumluluğunun *İn-Vitro* Hücre Kültürü Testleri ile Değerlendirilmesi

Sentezlenen EhHL'nin *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü IBSB Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen *in-vitro* deneylerde insan osteoblast hücre hattı (HoB) kullanılmıştır. Hücreler uygun besi ortamında (DMEM %10 FBS ve %1 penisilin -streptomisin) 37ºC sıcaklıkta ve nemlendirilmiş %5 CO_2 ortamında çoğaltılmıştır. Hücrelere

büyüme sürelerine göre belirli aralıklarla pasajlanmış, istenen yoğunluğa (%80) ulaşan hücreler tripsin ile yüzeyden kaldırılmıştır. Tutundukları yüzeyden kaldırılan hücreler sentezlenmiş hidrojellerin sterilize edilip şişirildikten sonra Bio-Oss® ile karıştırılmış halde veya tek başına hücre kültürü kaplarına konmuş ve üzerine süspanse hale getirilmiş hücreler ekilmiştir. Hücrelerle hidrojeller 24 saat 37ºC sıcaklıkta ve nemlendirilmiş %5 CO_2 ortamında çoğaltılmıştır. Ardından hücre proliferasyonunu ölçmede kullanılan WST-1 reaktifi ile 2 saat daha inkübe edilmiş ve optik yoğunlukları 470 nm de kaydedilmiştir. Deneyde kontrol grubu (sadece normal koşullarda inkübe edilen hücreler), 20 mg Enzimatik hidrolize levan hidrojeli (E20), 20 mg Bio-Oss® (B20), 10 mg enzimatik hidrolize levan ve 10 mg Bio-Oss® hidrojeli (E10B10) örnekler üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. İnsan osteoblast hücrelerinin hidrojeller ve Bio-Oss® ile 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı grafiği.

24 saat inkübasyon sonrası canlılık sırası ile %99,87, %119,3, %179,2 ve %172,8 olarak gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda EhL polimerinin tek başına Bio-Oss® dan daha iyi hücre canlılığı sağladığı ve eşit miktarda Bio-Oss® ile karıştırıldığında canlığının Bio-Oss® ve kontrol grubundan daha yüksek olduğu

gözlemlenmiştir (Şekil 3). Bu veriler ışığında en iyi canlılık gösteren enzimatik hidrolize levan polimerinin Bio-Oss®'dan az, (3:1), Bio-Oss® ile eşit (2:2) ve Bio-Oss®'dan yüksek (1:3) oranında karıştırılarak kullanılması ile hidrojel kullanımının kemik iyileşmesine desteğinin araştırılması hedeflenmiştir. Levanın hücre adezyonu ve hücre proliferasyonunu olumlu yönde etkilediğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Toksoy Öner vd., 2016). Bunlardan bazılarını özetleyecek olursak; düşük molekül ağırlıklı levan, poli(ε-kaprolakton) (PCL) ve jelatin 3D doku iskelesi ile yapılan çalışmada insan osteoblast hücrelerinin (Hob) artan levan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre adezyonu ve canlılık sonuçlarında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Duymaz ve ark., 2019**).** Axente ve ark., (2014) oksitlenmiş levan ve modifiye edilmemiş levanın kombine kullanıldığı film yüzeylerin SaOs2 osteoblast hücrelerinin ERK sinyallenmesini arttırdığını göstermişlerdir. Hasirci ve ar., (2006) levan temelli nanokompozitlerin kemik greftlerin yapısında destekleyici olarak kullanmışlardır. Cam nanopartiküller ile metakrilatlı levan hidrojelinin SaOs2 osteoblast hücrelerinin adezyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (Leite ve ark., 2014).

Hidrojellerin kalvaryal defekterin tedavisinde kullanıldığı diğer çalışmalar literatürde mevcuttur. Bir diğer çalışmada, jelatin ve lizinin üre içeren ArcGel kemik yenilemesi için barındırdığı adezyon birimleri ve porlu yapısı ile Bio-Oss® alternatifi olarak kritik boyut sıçan kalvaryal defektlerinde kullanılmış ve implantasyon sonrası ArcGel kullanımı ile oluşan kemik miktarının otolog grefte yakın ve Bio-Oss® greftinden daha yüksek ve fizyolojik olarak daha iyi olduğu gözlemlenmiş ve büyük defektlerde kullanımının daha işlevsel olabileceği öne sürülmüştür (Lohmann ve ark., 2017). Liu ve arkadaşları, enjekte edilebilir aljinat ve jelatin içeren LAPONITE hidrojeline sıçan kemik iliği mezenşimal kök hücrelerini enkapsüle etmiş ve hidrojelin hücrelerin canlılığının arttığını *in vitro* deneyler ile gözlemlemiştir. Aynı çalışmada 8 mm çapında sıçan kritik boyut kalvaryal defektlerine mezenşimal kök hücre yüklü hidrojeller uygulanmış ve kemik iyileşmesi gözlemlenmiştir (Liu ve ark., 2020).

5.3. Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının Temini ve Planlanan Operasyonların Gerçekleştirilmesi

5.3.1. Etik kurul onayı, destek veren kuruluş ve projeler

E-44697215-050.01.04-24484 sayılı ve 2021-10 kodlu etik başvurusu Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (BÜHADYEK) 27.07.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş ve onaylanmasına karar verilmiştir.

Çalışmamız, TUBİTAK 1002 projesi kapsamında "122S116 " proje numarası ile desteklenmektedir.

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO) tarafından TDH-2022-10547 proje numarası ile desteklenmektedir.

5.3.2. Deney hayvanlarının seçimi, bakımı ve barındırılması

Tez çalışmamız kapsamında 8 adet yetişkin, iskeletsel olarak gelişmiş, erkek, 6 aylık, ağırlıkları 3.5-4,5 kg olan YZBT kullanılmıştır. Tavşanlar, Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Birimi'nde belirlenen kurallara uygun olarak bakılmış ve barındırılmıştır. 2 hafta önceden kafeslerine ve yeni ortamlarına alıştırılmışlardır. 22–24˚C ±2˚C sıcaklıkta, 30-60% nemde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde, yüksek ve ürkütücü seslerden uzak olacak şekilde standart kafeslerde tekli olarak barındırılmışlardır. Standart diyet uygulanmış ve su ad libitum olarak verilmiştir (S. Jung ve ark., 2020; Saulacic ve ark., 2021).



Resim 3a ve 3b. Tavşanlar standart kafeslerinde tek birey olarak barındırılırlar (S.Jung ve ark., 2020).



Resim 4. Tavşanlar standart pelet gıdalarla beslenirler (S. Jung ve ark., 2020).

3R ilkeleri (Değiştirme, Azaltma ve İyileştirme), 50 yılı aşkın bir süre önce geliştirilmiş ve daha insancıl hayvan araştırmaları yapmak için bir çerçeve sağlanmıştır. O zamandan beri, hayvanların bilimsel prosedürlerde kullanımına ilişkin ulusal ve uluslararası mevzuat ve düzenlemelerin yanı sıra hayvan araştırmalarını finanse eden veya yürüten kuruluşların politikalarına dahil edilmiştir. Halkın tutumlarına ilişkin kamuoyu yoklamaları, hayvan araştırmalarına verilen desteğin 3R'lerin uygulamaya konmasına bağlı olduğunu tutarlı bir şekilde göstermiştir.

Değiştirme prensibi, mümkün olduğunca daha az gelişmiş organizmaya sahip canlılarda çalışmayı, *azaltma* prensibi mümkün olan en az sayıda hayvanla çalışmayı, *iyileştirme* prensibi ise deney sürecinde hayvanların acı çekmesini en aza indiren ve refahı artıran yöntemleri ifade etmektedir (https://nc3rs.org.uk/the-3rs).

3R kuralına göre kalvaryal defekt rejenerasyonunda tavşan modelini seçmemizin nedeni:

1-Amerikan Tavşan Yetiştiricileri Birliği'ne göre 49 tavşan ırkı vardır. Çeşitli ırklardan YZBT (5 ila 6 Kg), dental implantoloji ve biyomateryal araştırmaları için en yaygın olarak seçilenidir. Köpek ve domuz modellerinin altında tavşan, implant diş hekimliği araştırmalarında en sık kullanılan hayvanlardan biridir (Vignoletti ve Abrahamsson, 2012). Ekonomik, bilimsel, pratik ve etik konular tavşanı, yeni implant ve biyomateryallerin klinik öncesi çalışmalar için ideal bir model haline getirir (Stübinger ve Dard, 2013).

2-Oluşturulmak istenen defekt türü ile çalışılacak deney hayvanı arasında literatürde birçok kez desteklenmiş önemli bir ilişki vardır. İmplant çevresi defektlerde çalışılacaksa Türkiye'de yasak olmakla birlikte beagle köpeklerde (Thoma ve ark., 2017), çekim soketlerinde çalışılacaksa fare ve sıçanlarda (Li ve ark., 2019), kalvaryada birden çok dairesel veya dikdörtgen şeklinde defekt oluşturulacaksa tavşanlarda **(**R.E. Jung ve ark., 2006; Grossi-Oliveira ve ark., 2015) çalışılmıştır.

3-Fareler veya sıçanlar gibi küçük hayvanların aksine tavşan kalvaryasında yapılan cerrahiler, daha büyük anatomik boyut nedeniyle cerrahi sırasında daha fazla kontrol ve hassasiyet sağlayabilmektedir. Tavşan kalvaryası, insan kafatası gibi benzer bir embriyolojik gelişim ve kemikleşme sürecine sahip olduğundan, bu model deneysel ve translasyonel tıp için sağlam bir temel sağlamaktadır. İyileştirme ve yeniden üretilebilirlik, hayvan araştırmalarının iki ana karakteristiği olduğundan, tavşan kafatası modeli, bilim adamlarının bu önemli sorunlara kolayca cevap getirebileceği birkaç defekt modelinden biridir (Stübinger ve Dard, 2013).

4-Tavşanlar çok hızlı bir şekilde matürasyonlarını tamamlarlar. Kolay çalışılabilme ve yüksek kemik turnover hızı önemli avantajlarıdır. Gelişimsel olarak tavşan kalvaryası membranöz kemikleşme ile oluşur. Bu nedenle kalvaryal defekt modelleri maksillofasiyal bölgeyle benzerlik göstermektedir. Fizyolojik olarak kalvaryal kemik, atrofik mandibulaya benzerdir. Anatomik olarak ise kalvarya, mandibulaya benzer şekilde süngerimsi kemiğin arada kaldığı iki kortikal tabakadan oluşur. Aynı zamanda kalvaryal kemik deneysel çalışmalarda greft materyallerini ve kemik rejenerasyonlarını incelemek için uygun bir kemiktir (Castañeda ve ark., 2006).

5-Tavşan kalvaryası çoklu defekt oluşturulmasına izin verecek genişliğe sahiptir. Bu sayede çalışılmak istenilen tüm materyaller bir tavşanda uygulanabilir ve bireylere bağlı rejenerasyon kapasite farklılıklarından kaynaklanacak gözlemsel hatalar da ortadan kaldırılmış olur (Delgado-Ruiz ve ark., 2015).

6-Sıçanlar, tavşanlara göre gelişmişlik seviyeleri daha düşük olsa da daha az sayıda tavşan kullanılarak aynı etkinlikte sonuçlar elde edilebilmektedir (Liu ve ark., 2019). Aşağıdada gösterildiği üzere power analiz sonucu altı adet tavşan kullanılarak anlamlı sonuçlar elde edilebilmektedir. Ancak sıçanlarda her hayvan için tek bir defekt oluşturulabileceğinden çok daha fazla sayıda sıçanla çalışmak gerekmektedir (Seno ve Hankenson, 2020; Lucatelli ve ark., 2018; Aroni ve ark., 2019).

Örneklem boyutu hesaplanması için G*Power 3.1.9.4 programı kullanılmıştır. Liu ve ark. tarafından yapılmış olan çalışmada, tavşan kalvaryalarında sirküler, simetrik, 8mm çapında, 4 adet defekt oluşturulmuştur. Her defekt bir grubu temsil etmektedir. 1'i kontrol 3'ü çalışma olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur ve bu grupların ana sonuç ölçütü olan yeni kemik oluşum yüzdelerinin sırasıyla mean ± standart sapma değerleri *62.64±4.72, 66.25±2.83, 67.82±1.93 ve 70.79± 3,09* olarak bulunmuştur. Alpha değeri *(α)= 0.05, P(1-ß) =0,95* kabul edilip effect size *0,2698601* olarak hesaplanmıştır. Bunun sonucunda anlamlı bir istatistiksel fark bulunabilmesi için her bir grup için örneklem büyüklüğü 6 olmak üzere toplamda 24 olarak hesaplanmıştır (Liu ve ark., 2020) ancak tavşanların kalvaryal bölgesinde çalışılacağı için olası ölümler ve çalışma dışı kalma durumları göz önüne alınarak her grup için %20 daha fazla örneklem boyutu hesaplanmıştır. Bu da her grup için 8 totalde 32 tane örneklem büyüklüğüne karşılık gelmektedir.

5.3.3. Kullanılan araç ve gereçler

Çalışmada;

- Anestezi amaçlı %2'lik Xylazine, %10'luk Ketamine ve %1'lik İsofluran ,



Resim 5a, 5b ve 5c. Tavşanların anestezisi amacıyla kullanılan anestezikler (Xylazin, Isoflurane, Ketalar) (Stumbras ve ark., 2020).

- Anestezik maddelerin enjeksiyonu için 2 cc’lik tek kullanımlık dental enjektörler, operasyon bölgesinin irrigasyonu amacıyla tek kullanımlık steril 20 cc enjektör,
- Tavşanlarda ameliyat öncesinde asepsi ve antisepsi amacıyla; %1'lik Batikon, steril cerrahi önlük, maske, eldiven, bone, tampon ve örtü,
- No:15 bistüri, bisturi sapı, ekartör, periost elevatörü, hemostat, portegü, doku pensi, izotonik sodyum klorür, 8 mm çapında trefan frez, mikro motor (1200 rpm), rezorbe olabilen sütur (PEGALACT® 4:0;3,0), sütur makası,



Resim 6. Trefan frez seti (Hong ve ark., 2020).

- Toz haline getirilmiş levan hidrojeli,

- Sığır kaynaklı, ksenojenik, Bio-Oss® *(Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)* kemik grefti,



Resim 7. Bio-Oss® ksenojenik kemik grefti

- Domuz kaynaklı, ksenojenik, Bio Gide *(Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) membran*



Resim 8. Bio-Gide® kollajen membran

- Membran fiksasyonu amacıyla titanyum pinler, pin tutucu ve çekiç,



Resim 9. Titanyum pin seti; pin, pin kutusu, pin tutucu ve çekiçten oluşmaktadır.

- Radyolojik ve histolojik inceleme amacıyla örneklerin elde edilmesi ve saklanması amacıyla; elmas separe disk, biyopsi kapları ve %10'luk formaldehit solüsyonu kullanılmıştır.



Resim 10. Elmas separe disk frezi



Resim 11. Operasyon öncesi hazırlanmış cerrahi masa

5.3.3.1 Bio-Oss® kemik grefti

Literatürde, en sık tercih edilen ksenogreftin; otojen kemik greftiyle kıyaslandığında, başarılı sonuçlar elde edilen Bio-Oss® *(Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)* olduğu belirtilmiştir (Shamsoddin ve ark., 2019). Bu nedenle çalışmamızda Bio-Oss® kemik grefti tercih edilmiştir. Geistlich Bio-Oss® farklı partikül büyüklüklerine sahiptir. Çalışmamızda, kemiğe daha iyi adapte olabilmesi, küçük defektleri tam olarak doldurabilmesi ve manipülasyonunun daha kolay olması açısından küçük partiküllü Geistlich Bio-Oss® (0.25 mm-1 mm) kullanılmıştır.

5.3.3.2. Bio-Gide® kolajen membran

Geistlich Bio-Gide®, güvenilir kemik rejenerasyonu ve optimal doku entegrasyonu için çok fazla tercih edilen bir kolajen membrandır (Schwarz ve ark., 2006; Rothamel ve ark., 2005; Schwarz ve ark., 2014). Geistlich Bio-Gide®'in doğal kolajen yapısı, hızlı ve homojen vaskülarizasyona izin verir ve böylece optimal doku entegrasyonu ve yara stabilizasyonu sağlar (Rothamel ve ark., 2005). Geistlich Bio-Gide®'ın pürüzsüz yüzeyi, yumuşak dokunun defektin içine doğru büyümesini engeller ve fibroblastların bağlanması için bir iskelet görevi görür (Tal ve ark., 2008; Zitzmann ve ark., 1997; {Rothamel ve ark., 2004). Geistlich Bio-Gide®'nin pürüzlü tarafı ise kemik hücreleri ve kan damarları için bir çerçeve görevi görür (Schwarz ve ark. 2008). Geistlich Bio-Gide®, Geistlich Bio-Oss® gibi bir kemik grefti ile kombine halinde kullanılır. Çalışmamızda Bio-Oss® kemik greftiyle kombine olarak, Bio Gide® kollajen membranı kullanılmıştır

5.3.4. Çalışma grupları

Çalışmamızda, 8 adet YZBT'nin kalvaryasında, parietal kemikte; simetrik, 8mm çapında ve 2mm derinliğinde, 4 adet sirküler defekt oluşturulmuştur (Liu ve ark., 2020). *Her defekt bir grubu temsil etmektedir.* 1'i kontrol 3'ü çalışma olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur;

Her bir tavşanda oluşturulan 4 adet defekt randomize olarak:

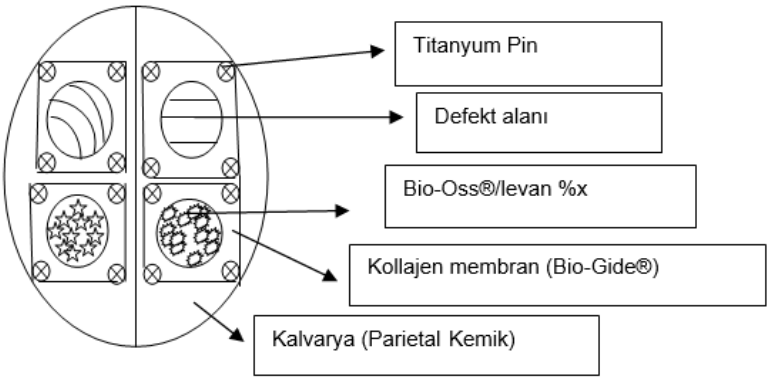
Defekt 1- Bio-Oss®/levan (4:0) + Bio-Gide® (Kontrol Grubu) (G0)

Defekt 2- Bio-Oss®/levan (3:1) + Bio-Gide® (G1)

Defekt 3- Bio-Oss®/levan (2:2) + Bio-Gide® (G2) } Çalışma grupları

Defekt 4- Bio-Oss®/levan (1:3) + Bio-Gide® (G3)

- Her hayvan kendinin kontrolüdür.
- Her grupta 8 adet defekt bulunmaktadır.



Şekil 4. Tavşan kalvaryalarında oluşturulan defektlerin şematik gösterimi

5.3.5. Çalışma planı

5.3.5.1. Tavşanların anestezi altına alınması

Diazepamın intramüsküler enjeksiyonu (1-2 mg/kg) ile premedikasyondan sonra, ksilazin hidroklorür (5 mg/kg) ile kombine ketamin hidrokloridin (35 mg/kg) intramüsküler enjeksiyonu ile genel anestezi indüklenmiştir. Operasyon boyunca anestezinin idamesi için %1-3'lük konsantrasyonda isoflurane inhalasyon anesteziği nazotrakeal maske ile verilmiştir (Stumbras ve ark., 2020).

5.3.5.2. Cerrahi bölgenin hazırlanması ve dezenfeksiyonu

Deneklerin operasyon bölgesi traş edilip ardından tüy dökücü krem uygulanarak kıllardan arındırıldıktan sonra tavşanlar, operasyon odasına nakledilmiştir. %1'lik lidokain hidroklorür solüsyonu ile cerrahi bölgenin lokal anestezisi sağlanmıştır (Saulacic ve ark. 2017).



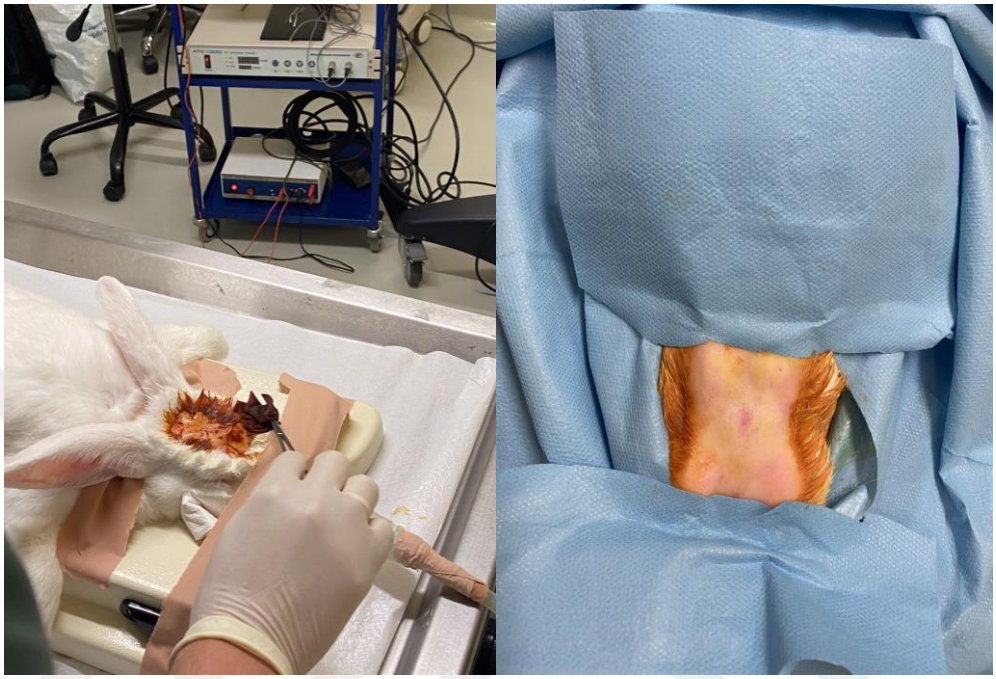
Resim 12a ve 12b. Tavşanların operasyon bölgesinin traş edilmesi ve lokal anestezisinin sağlanması.

Tavşanlar özel anestezi platformuna yerleştirip operasyon sırasında baş bölgesinin hareket etmesinin önlenmesi amacıyla flaster yardımıyla sabitlenmiştir.



Resim 13a, 13b ve 13c. Operasyon öncesi cerrahi sahanın, flaster yardımıyla baş ve boyun bölgesinden sabitlenmesi.

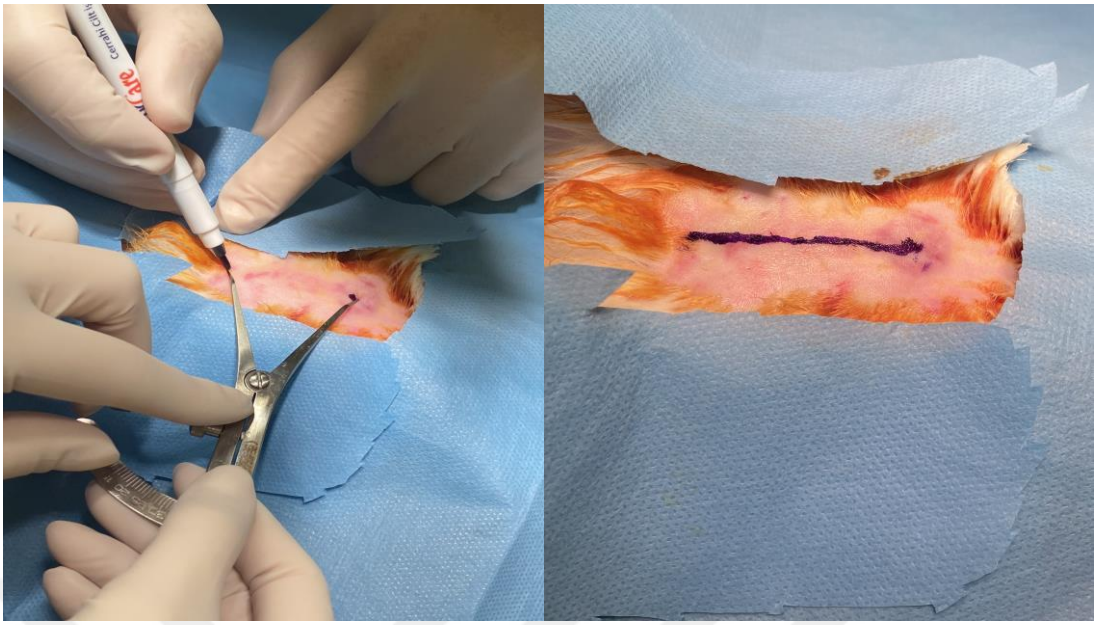
Cerrahi bölge %10'luk iyodin solüsyonu (Baticon) ile dezenfekte edildikten sonra asepsi ve antisepsi şartları gereği sadece cerrahi bölge açıkta kalacak şekilde tavşanlar, steril cerrahi örtülerle örtülmüştür.



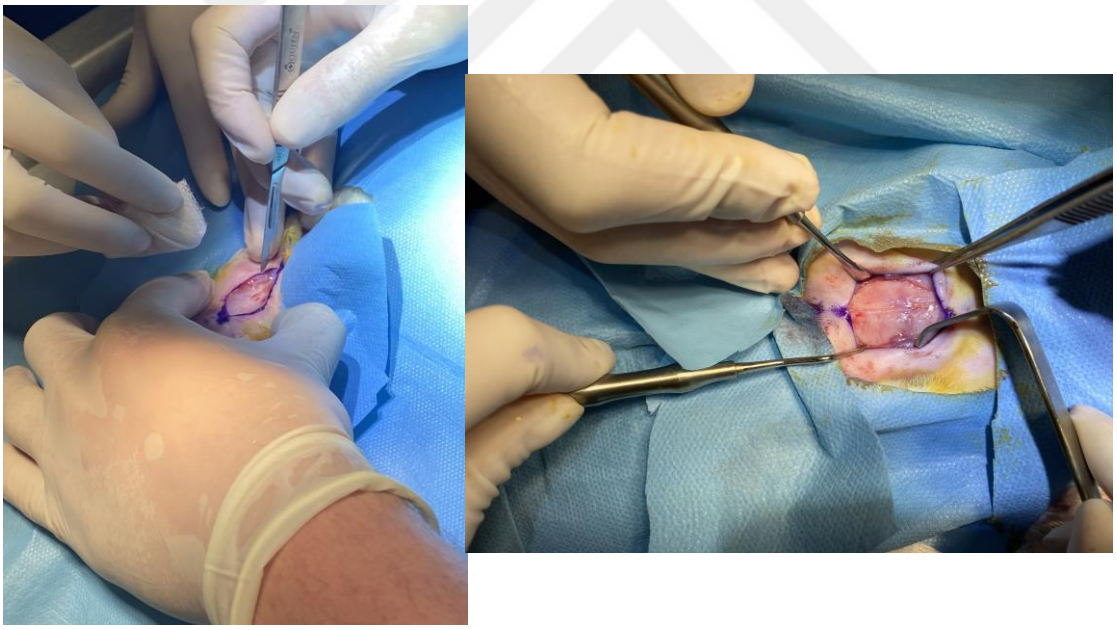
Resim 14a ve 14b. Cerrahi bölgenin dezenfeksiyonu ve steril örtülerle örtülmesi.

5.3.5.3. Cerrahi operasyon aşamaları

Kulak kıstırma ve ayak çekme işlemlerine karşı herhangi bir refleks meydana gelmediğinde genel anestezinin tam olarak sağlandığı anlaşılmaktadır. Supraorbital bölgeden eksternal oksipital çıkıntıya kadar sagital düzlemde 4 cm'lik lineer insizyon 15 no'lu bistüri kullanılarak yapılmıştır. Periost elevatörü ve hemostat yardımıyla cilt, ciltaltı ve periost dokuları diseke edildikten sonra interparietal sütur ve parietal kemik ekspoze edilmiştir (Hong ve ark., 2020).

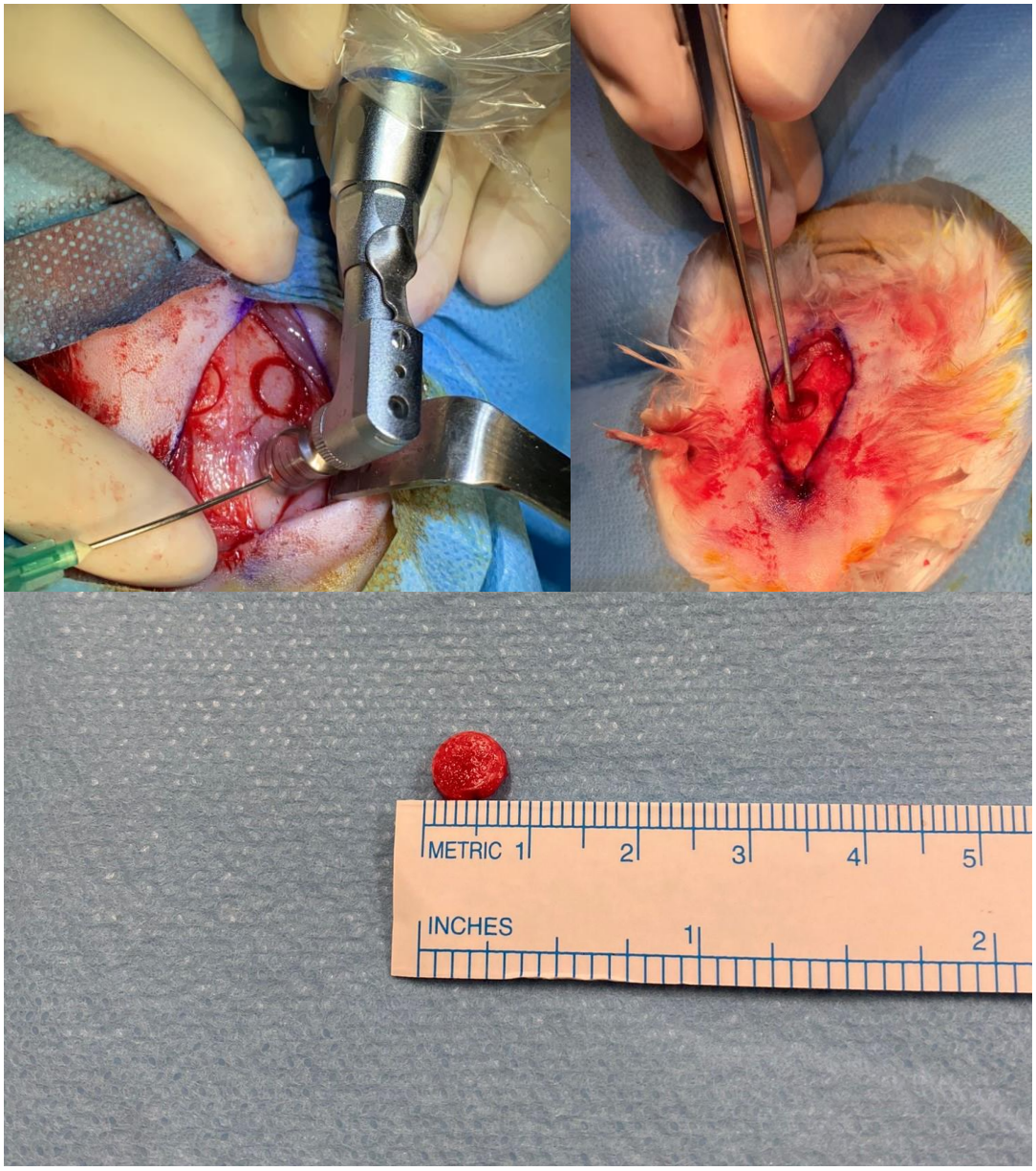


Resim 15a ve 15b. İnsizyon hattının ve uzunluğunun belirlenmesi.

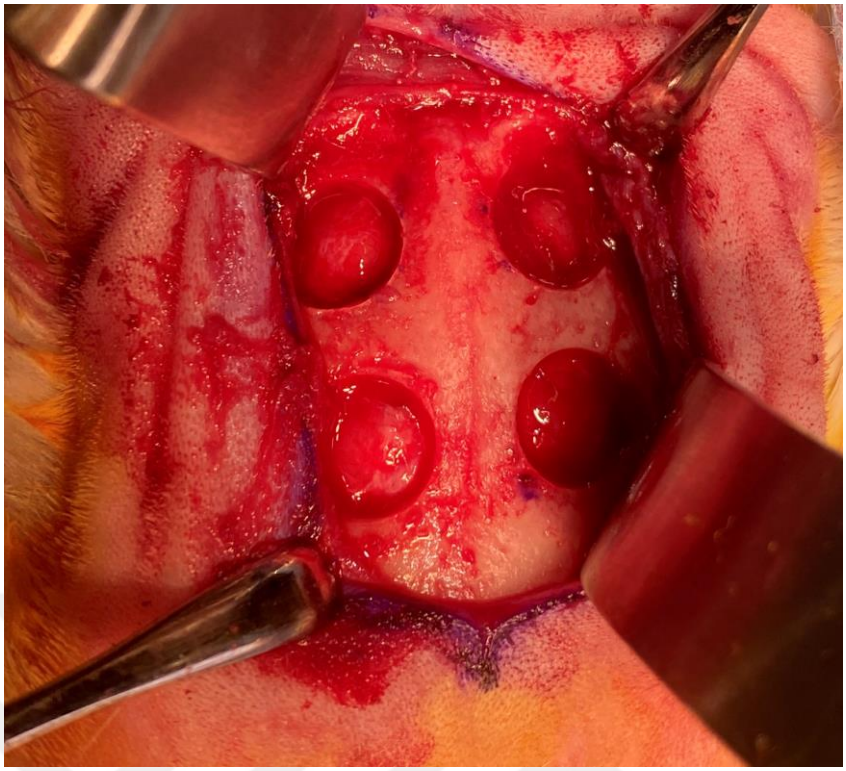


Resim 16a ve 16b. Cerrahi bölgenin inzisyonu ve mukoperiostal flapin kaldırılması.

Kanama kontrolü sağlandıktan sonra 8 mm çapında trefan frez kullanılarak, %0,9'luk serum fizyolojik irrigasyonu altında; interparietal sütura simetrik olacak şekilde dört adet 8 mm çapında 2mm derinliğinde sirküler defekt oluşturulmuştur (Hong ve ark., 2020).

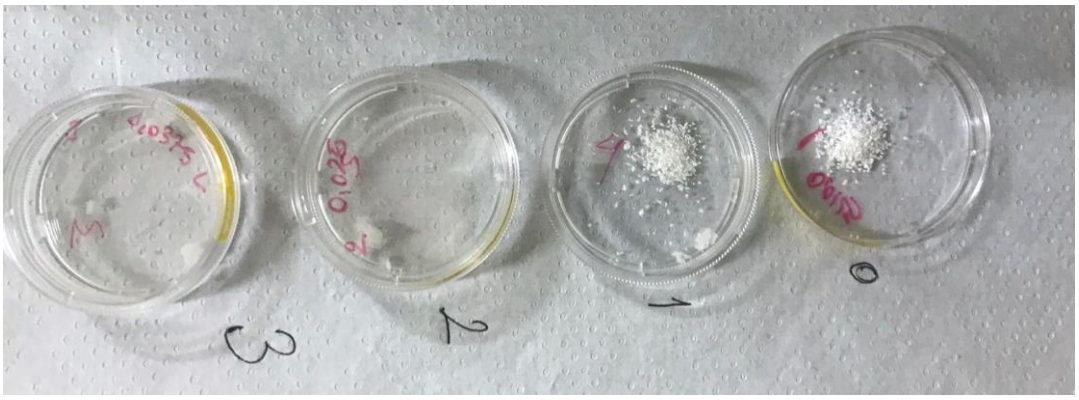


Resim 17a, 17b ve 17c. Kalvaryada defektlerin oluşturulması ve dairesel kemik kapaklarının çıkarılması.



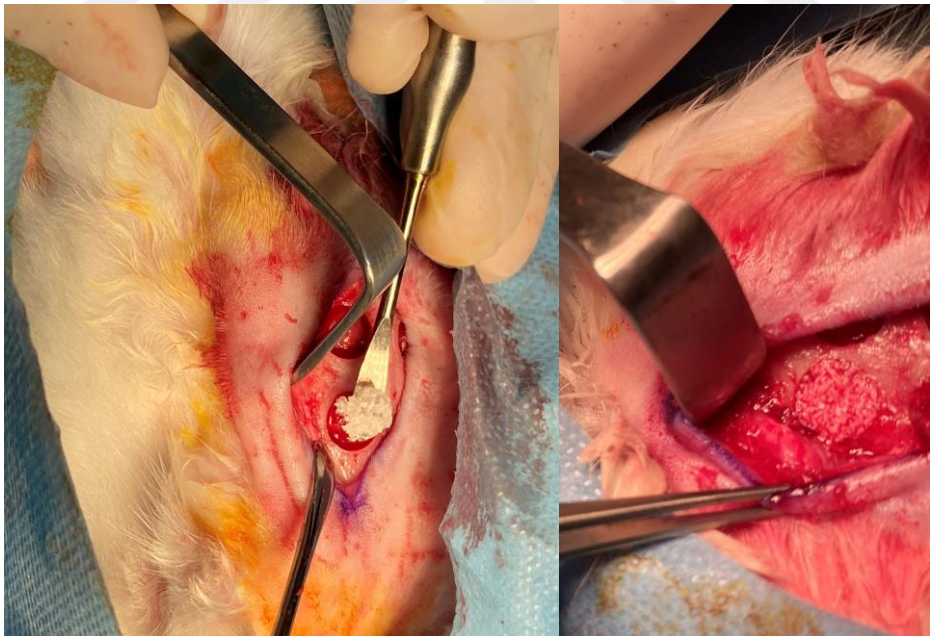
Resim 18. Tavşan kalvaryasında birbirine simetrik olarak oluşturulmuş dairesel defektler.

Levan hidrojeli jel formuna getirilmiş ve belirlenen oranlarda Bio-Oss® ile karıştırılıp defektlere uygulanmıştır [Bio-Oss®/levan; **(G0; 4:0, G1; 3:1, G2; 2:2, G3; 1:3).** Her bir tavşanda, hangi defekte hangi kombinasyonun uygulanacağı randomizasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Grupların seçimi için yapılacak randomizasyon yöntemi, www.randomization.com adresinde bulunan açık yazılım aracılığı ile yapılmıştır ve bilgisayar destekli randomizasyon yöntemi kullanılmıştır (Stumbras ve ark., 2020; Saulacic ve ark., 2021).

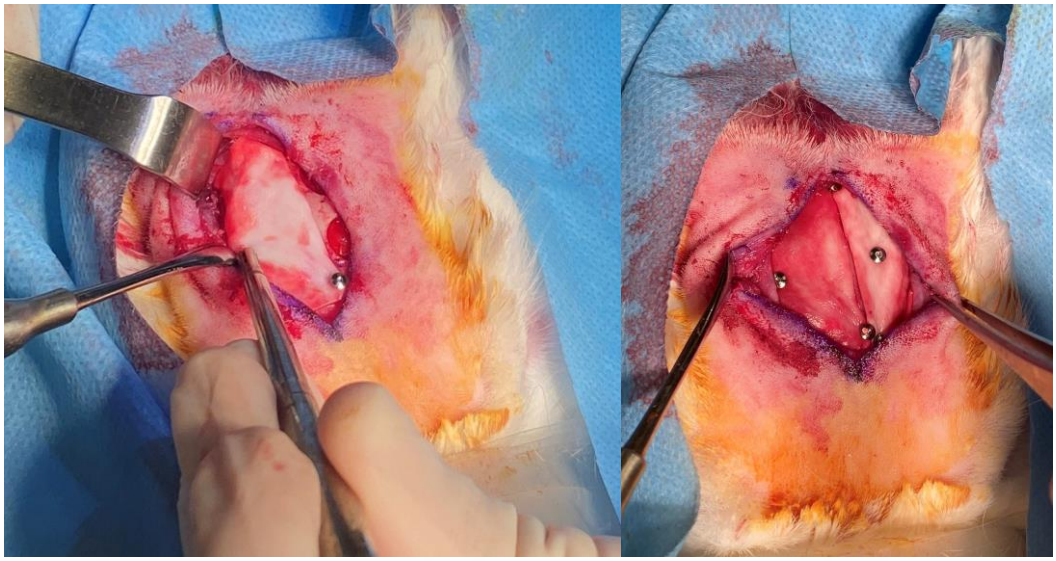


Resim 19. Steril petri kaplarında Bio-Oss®/levan farklı oranlarda olacak şekilde kombine edilmiştir.

Bio-Oss® ve levan hidrojeli defektlere uygulandıktan sonra 25x25mm boyutlarındaki kolajen membran (Bio Gide®) defektlerin üstünü örtecek şekilde yerleştirilmiştir. Defektleri 2mm çevreleyecek şekilde titanyum pinler kullanılarak membranlar kalvaryaya sabitlenmiştir. Periost ve ciltaltı dokular 4/0, cilt ise 3/0 Pegalact® sütur ile kapatılmıştır.



Resim 20a ve 20b. Belli oranlarda kombine edilen LH ve Bio-Oss® kemik grefti, defektlere uygulanmıştır.



Resim 21a ve 21b. Defektlerin üzeri Bio-Gide® kolajen membran ile titanyum pinler kullanılarak örtülmüştür.



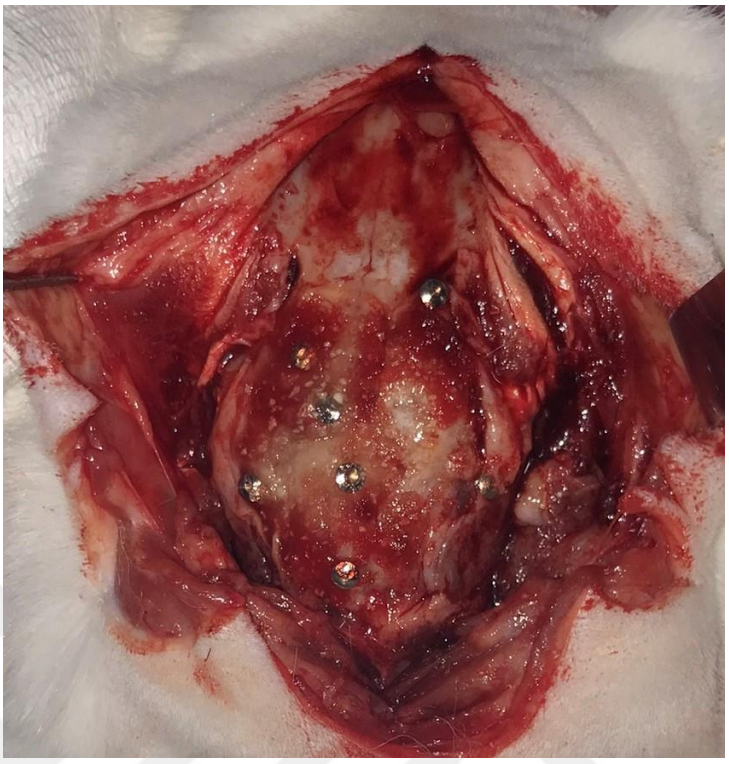
Resim 22. Cerrahi bölge 3/0 ve 4/0 Pegalact® sütur ile tabakalı olarak kapatılmıştır.

İntraoperative analjezi buprenorfin hidroklorit 0,15 mg/kg *(Temgesic, Rechitt Benckiser, Wallosellen, Switzerland)* ile intramusküler enjeksiyon yapılarak sağlanmıştır. Postoperatif olarak 0,8ml/kg gentamisin antibiyotiği ve 0,8mg/kg meloksikam analjeziği 3 gün boyunca günde 1 kez olacak şekilde intramusküler enjeksiyon ile tavşanlara uygulanmıştır. Operasyon sonrası 8 haftalık takip süresince; kilo, beslenme alışkanlıkları ve davranışlar haftalık periyotlarla takip edilmiştir. Hemogram ve CRP değerleri 2 haftalık periyotlarla tavşanların kulak veninden (marjinal ven) kan alınarak incelenmiştir. Ameliyat sonrası, ameliyattan sonraki ilk günden sekizinci haftaya kadar tavşanların beslenme, yara bakımı ve gözlemlenmesi bir veteriner hekim tarafından sağlanmıştır (Stumbras ve ark., 2020).

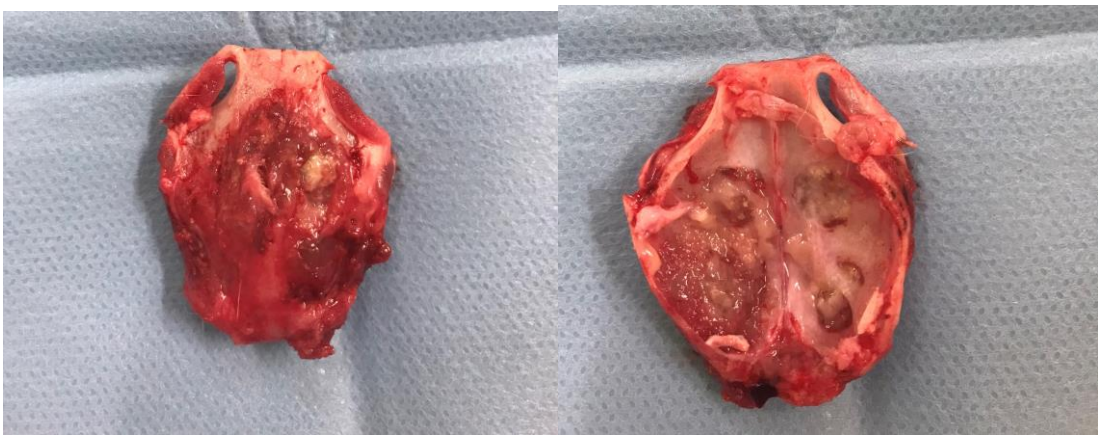
5.3.6. Çalışmanın sonlandırılması ve örneklerin elde edilmesi

Operasyon sonrası 8 haftalık takip süreci tamamlanmış olan tavşanların yüksek doz sodyum pentobarbital (>100 mg/kg) (IV, IP) ile ötenazisi veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir. Vital bulguların kontrolünü takiben ex olup olmadıkları kontrol edildikten sonra örnek alınma işlemine geçilmiştir.

İlk operasyon bölgesinden tekrar insizyon yapılarak dokular diseke edilmiştir. Daha önceden oluşturulan defekt bölgeleri tekrardan ekspoze edilmiştir. Kalvaryalar (örnekler) radyolojik ve histolojik incelemeler için elmas separe disk yardımıyla kranyumdan ayrılmıştır. Her bir kalvarya ilgili tavşan numarasına göre içinde %10'luk formaldehit solüsyonu olan biyopsi kaplarına konulmuştur (Özer ve ark., 2022).



Resim 23. 8 haftalık takip süreci sonunda cerrahi bölgedeki iyileşmenin görünümü.



Resim 24a ve 24b. Elmas separe disk yardımıyla kalvaryadan ayrılan parietal kemiğin ve defektlerin görünümü.

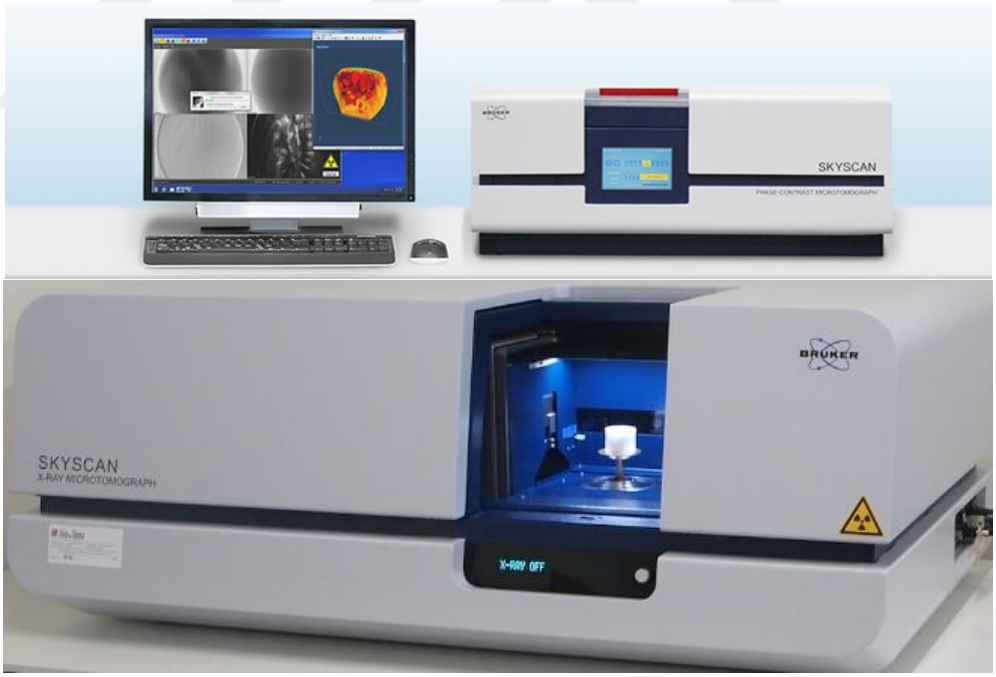
5.4. Örneklerin Radyolojik İncelemelerinin Yapılması

Yeni oluşan kemik ve yumuşak doku ölçümü için en güvenilir yöntemler iki boyutlu histomorfometrik analiz ve üç boyutlu mikro bilgisayarlı tomografidir (mikro-BT). Ancak mikro-BT analizi ile karşılaştırıldığında, histomorfometrik analiz daha büyük kesitler gerektirir. Bu nedenle mikro-BT analizi kullanılarak yapılan çalışmaların daha doğru ve detaylı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Deluiz ve ark., 2015).

X-ışını bilgisayarlı mikrotomografi, kemikle ilgili araştırmalarda değerli bir uygulama olduğu tespit edilmiş, geleneksel bilgisayarlı aksiyal tomografinin minyatürleştirilmiş bir şeklidir. Bu teknoloji, küçük X-ışını opak nesnelerinin iç yapısının invaziv olmayan ve tahribatsız bir şekilde 3D rekonstrüksiyonunu sağlar (Özer ve ark., 2017).

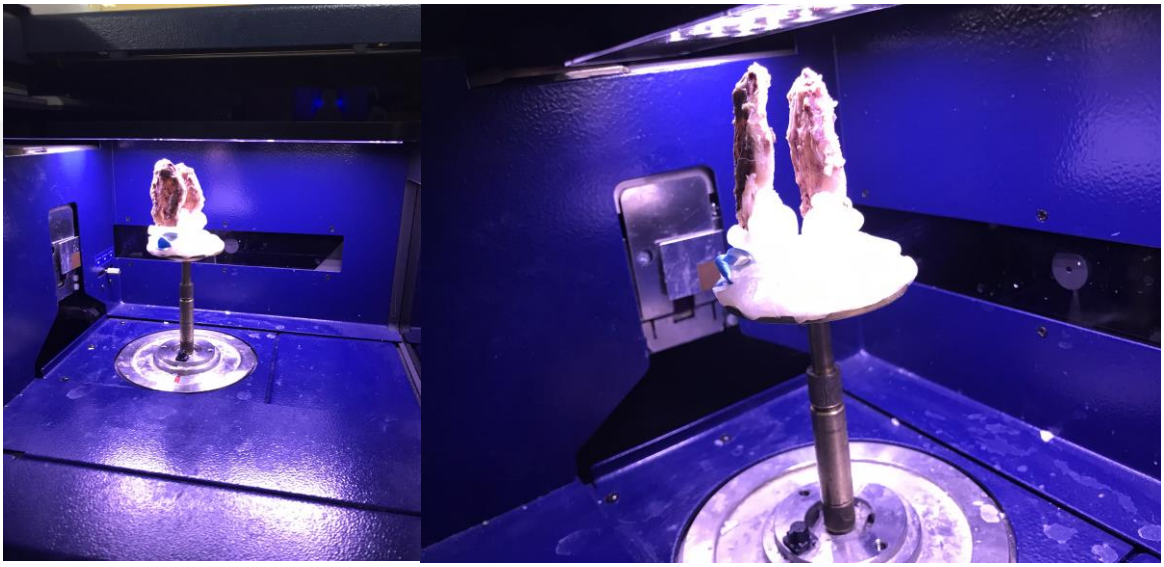
Yeni kemik oluşum miktarının üç boyutlu değerlendirilmesinde mikro-BT, altın standart olarak kabul edilmektedir. Örnekler üzerinde hasara neden olmadığı için mikro-BT görüntüleme ilk inceleme olarak tercih edilir. Sonrasında örnekler mekanik veya histolojik analizlerden geçirilebilir. Mikro-BT, kallus özelliklerinin belirlenmesi ve daha sonra elde edilen biyomekanik verilerle kallus arasındaki ilişkilerin incelenmesi amacıyla da kullanılabilir. Bouxsein ve ark, mikro-BT yöntemi ile kemik oluşumunu değerlendiren çalışmaların raporlarının standardizasyonu için kılavuz yayınlamıştır. Farklı mikro-BT cihazları ile yapılan çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılması mümkün olabilmektedir. Bu kılavuza göre, mikro-BT görüntüleri değerlendirilirken kemik hacim fraksiyonu, trabekül sayısı, kalınlığı ve ayrımı gibi trabeküler kemik morfolojik özellikleri raporda tanımlanmalıdır (Bouxsein ve ark., 2010).

Örnekler, piksel boyutu 40 µm olan bir mikro-BT cihazı (Skyscan 1174; Skyscan, Kontich, Belçika) kullanılarak taranmıştır. X-ışını tüpü voltajı 50 kV'a ve akım 800 µA'ya ayarlanmıştır. Maruz kalma süresi 2300 ms'tir. X-ışını projeksiyonları 0,70° aralıklarla, 180° tarama açısal dönüşüyle elde edilmiştir. Tarama aşamasında elde edilen ham veriler daha sonra üretici tarafından sağlanan NRecon yazılımı (NRecon sürüm 1.6.9.4; Skyscan, Kontich, Belçika) kullanılarak yeniden oluşturulmuştur. NRecon kullanılarak yeniden oluşturulan 8 bitlik gri görüntüler CTan yazılımına aktarılmıştır (sürüm 1.13.5.1; Skycan). Bu analiz ile defekt içerisindeki oluşumları, mikron düzeyinde görüntülemeyle alınan görüntü kesitleri ile defekt alanının 3 boyutlu modeli oluşturulmuştur. Bu şekilde defekt dolumu ve kemik oluşumu en hassas ve mikron düzeyde gözlemlenebilmiştir. Örneklerin mikro-BT incelemesi Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'nda hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.



Resim 25a ve 25b. Mikro-BT cihazının görünümü.

Kemiğin kortikal morfometrisini tanımlamak için kortikal kalınlık, kortikal kemik alanı, kortikal kemik alan fraksiyonu ve total kesit alanı belirtilmiştir. 8.haftanın sonunda tavşanlar sakrifiye edildikten sonra tavşan kalvaryaları 24 saat formaldehitte bekletilmiş, ardından defektlerin mikro-BT görüntüleri alınarak defektlerdeki yeni kemik oluşumları, defektlerin kapanma oranları, yeni oluşan kemik yüzey alanı ve trabeküler kalınlık tespit edilmiştir **(Wang ve ark., 2021).**



Resim 26a ve 26b Tavşan kalvaryalarında yer alan defektler, mikro-BT cihazında radyolojik olarak incelenmiştir.

5.5. Doku Örneklerinin Histopatolojik ve Histomorfometrik İncelemelerin Yapılması

Tanımlayıcı histoloji ve histomorfometri, histolojik değerlendirmenin iki ana sınıfıdır. Tanımlayıcı histoloji, hücre morfolojisi, yapısı ve hücre dışı matris ile veya implante edilmiş bir malzeme ile arayüz içindeki düzenleme ile ilgili veriler vererek, ilgilenilen dokunun genel bir değerlendirmesini sağlamak için kullanılır. Yarı niceliksel analiz, verilerin parametrik olmayan varyans analizi kullanılarak değerlendirilebildiği bir puan sistemi kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Histomorfometri, ilgili bileşenlerin uzunluk ve mesafe, alan ve sayısı ile ilgili histolojik verilerin nicel analizine izin verir (Vignery ve Baron, 1980; Parfitt ve ark., 1987).

Daha yüksek kemik hacmi ve kemik yoğunluğu, daha yüksek kemik-implant teması ve sonuçta daha yüksek implant ömrü ile sonuçlandığından yeni kemik (NB) miktarı, greft materyallerini değerlendirmek için önemli bir kriterdir (Handschel ve ark., 2009; Pekozer ve ark., 2021; Yalcin Ülker ve ark., 2017; Güleç ve ark., 2017).

Histomorfometrik analiz, greftlenmiş bölgelerde NB, RG (rezidüel greft) ve ST (yumuşak doku) miktarını tahmin etmek için altın standart yöntem olarak kabul edilir (Iwaniec ve ark., 2008). Histomorfometrik analiz, NB ve RG parçacıkları için faz arasını tam olarak değerlendirme yeteneğine sahiptir (Chackartchi ve ark., 2011). Çeşitli greftleme materyallerinin histomorfometrik değişkenleri (NB, RG, ST) gelecekteki greftin kalitesini, yoğunluğunu ve hacimsel stabilitesini tanımlayabileceğinden, ogmentasyon prosedürlerinde uygulanmadan önce dikkate alınması önemlidir.

Doku örnekleri 8 mm'lik defektin çevresinde 2 mm sağlam kemik dokusu olacak şekilde 1 cm'lik çapta çıkarılmıştır. Işık mikroskobunda incelenecek dokular, +4°C'de, %10'luk formaldehit solüsyonu içeren doku kaplarına alınmıştır ve 2 hafta bekletilmiştir. Fiksasyon aşamasından sonra dokular Morse solüsyonunda (%22,5 formik asit ve %10 sodyum sitrat) 4 hafta boyunca dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyon boyunca, solüsyon haftada iki kez değiştirilmiştir. Dekalsifikasyon işlemini takiben doku örnekleri takip sürecine alınmıştır. Alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş, ardından parafine gömülmüştür (Tablo 1). Alınan kesitler poly-L-lysin kaplı lamlara aktarılmıştır. Lamlara alınan kesitlerden histomorfometrik olarak incelenecek dokular Trikrom Masson (TCM) ile (Tablo 2); histopatolojik olarak incelenecek dokular ise Hematoksilen&Eosin (H&E) ile boyanarak kapatılmıştır (Tablo 3).

Hematoksilen&Eosin ile boyanan dokular ise ışık mikroskobunda vaskülarizasyon, enflamasyon, kanama, aktif osteoblast yoğunluğu, yeni kemik oluşumu, fibröz doku oluşumu ve rezidüel biyomateryal oranı; histopatolojik açıdan, grupları bilmeyen bir histolog tarafından değerlendirilmiştir. Değerlendirmede Karakoyun ve arkadaşlarının histopatolojik skorlama kriterleri kullanılmıştır (Tablo 4) (Karakoyun ve ark., 2011).

Tablo 1. Doku takip aşamaları.

Kullanılan Kimyasal	Süre
Çeşme suyunda yıkama	8 saat
%70'lik etil alkol	1 saat
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1,5 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilen 2	1 saat
Parafin 1	1 saat
Parafin 2	3 saat

Tablo 2. Masson Trikrom (TCM) boyama aşamaları.

İstasyon	Süre	Kullanılan Malzeme
Etüv	10 dk	
Fırın	3 dk	
	3 dk	Ksilen
	3 dk	Ksilen
	5 dk	Ksilen
	2 dk	%100 lük etil alkol
	2dk	%96 lık etil alkol
	2 dk	%70 lik etil alkol
	1 dk	Distile Su
	4 dk	Hematoksilen
	1 dk	%1 lik asit alkol
Yıkama	1 dk	
	5 dk	Asit Fuksin
	1 dk	Distile Su
	5 dk	Fosfomolibdik Asit
	6 dk	Ligth Green (Metilen Mavisi)
	1 dk	Distile Su
	2 dk	%1 lik asit alkol
	1 dk	%70 lik etil alkol
	1 dk	%80 lik etil alkol
	1 dk	%96 lık etil alkol
Çıkış	1 dk	%100 lük etil alkol
Manuel	5 dk	Ksilen 1
Manuel	5 dk	Ksilen 2

Tablo 3. Hematoksilen ve Eozin boyama aşamaları.

İstasyon	Süre	Kullanılan Malzeme
Etüv		
Fırın	3 dk	
	3 dk	Ksilen
	3 dk	Ksilen
	5 dk	Ksilen
	2 dk	Hematoksilen
Yıkama	2 dk	
	1 dk	Asit Alkol
Yıkama	1 dk	
	2 dk	%80'lik Alkol
	7 dk	Eozin
	1 dk	%80'lik Alkol
	30 sn	%96'lık Alkol
	30 sn	%96'lık Alkol
	1 dk	%96'lık Alkol
	1 dk	%100'lük Alkol
	1 dk	Ksilen
	1 dk	Ksilen
Çıkış	1 dk	Ksilen

Tablo 4. Histopatolojik skorlama kriterleri (Karakoyun ve ark., 2011).

Skor	Bulgu
0, 1, 2 ve 3	Yeni Kemik Oluşumu
0, 1, 2 ve 3	Fibröz Doku Oluşumu
0, 1, 2 ve 3	Vaskülarizasyon
0, 1, 2 ve 3	Kanama
0, 1, 2 ve 3	Enflamasyon
0, 1, 2 ve 3	Osteoblast Yoğunluğu
0, 1, 2 ve 3	Rezidüel Biyomateryal

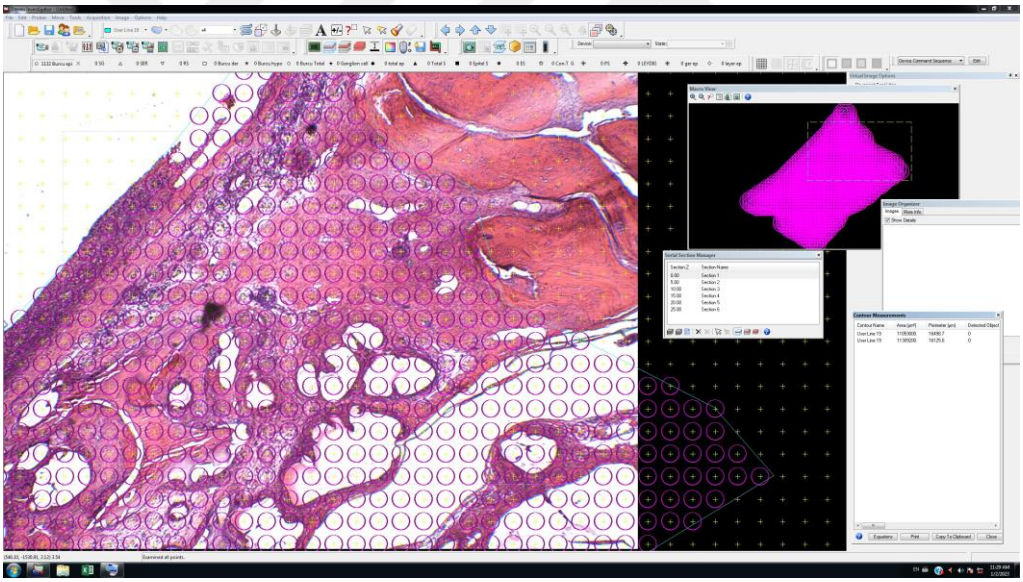
0: yok; 1: az; 2: orta; 3: şiddetli (çok)

Doku örneklerinde histopatolojik olarak; yeni kemik oluşumu, fibröz doku oluşumu, vaskülarizasyon, kanama, enflamasyon, aktif osteoblast yoğunluğu ve rezidüel biyomateryal miktarı incelenmiştir (Tablo 4). Histomorfometrik olarak ise yeni defekt kapanma oranı (%) incelenmiştir (Stumbras ve ark., 2020).

Histomorfometrik incelemeler için Leica 4000B mikroskobu kullanılmıştır. Histopatolojik incelemeler için Leica 6000 mikroskobu ile Leica Application Suit görüntü analiz programı kullanılmıştır. Trikrom Masson ile boyanan kesitler, CCD dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, USA), görüntü kartı (ATI FireGL Advance Micro Device, Camberly, UK), bilgisayar kontrollü motorize stage, (Bioprecision, Howtrone, NY, USA), Mikrokatör (Heidenhein, Traunreut, Germany) ve ışık mikroskobundan (Leica DM 4000B, Wetzlar, Germany) oluşan stereoloji çalışma istasyonunda incelenmiştir. Ölçümler yukarıda belirtilen

mikroskopta Sterioinvestigator 11.0 (Microbrightfield, Williston, VT, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Hacim ölçümleri için Leica C Plan X10 objektif (NA = 0.22) kullanılmıştır

Kemik hacminin hesaplanmasında Sterioinvestigator görüntü analiz programının Cavalieri sondasından yararlanılmıştır. Cavalieri yöntemi, düzenli bir geometrik şekle sahip olmayan üç boyutlu nesnelerin hacimlerinin birbirine paralel dilimlere ayrılarak hesaplanmasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile önce hacmi hesaplanacak yapı, dilimlere ayrılır ve her kesitin yüzey alanı bulunup, kesit kalınlığı ile çarpılarak ilgili dilimin hacmi hesaplanır. Nihayet dilimlerin hacimleri toplanarak ilgilenilen yapının toplam hacmi bulunur (Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Schmitz ve Hof, 2005; Güleç ve ark., 2017).



Resim 27. Sterioinvestigator görüntü analiz programında Cavalieri Metodu'nun uygulanması.

5.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızın istatistiksel analizleri GraphPad Prism 8.3.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm gruplar için her bir verinin tanımlayıcı (ortalama, medyan, standart sapma, standart hata) verileri hesaplanmıştır. Verilerin dağılımının normalliği incelenirken, istatistiksel testler (Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov) kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımına göre parametrik veya parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken normal dağılan parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi ve farklılık meydana gelen grubun tespit edilmesinde ve grupların ikili karşılaştırılmasında Tukey HDS testi kullanılmıştır. Niteliksel, parametrik olmayan verilerin karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. $P<0.05$ istatistiki anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Klinik Bulgular

Çalışma süresince işlemler ve yapılan enjeksiyonlar genel olarak tavşanlar tarafından iyi tolere edilmiştir. Biri solunum güçlüğü diğeri ise intrakraniyal kanama kaynaklı olmak üzere postoperatif birinci günde iki tavşan kaybedilmiştir.

Operasyon sonrası 8 haftalık takip süresince; kilo, beslenme alışkanlıkları ve davranışlar haftalık periyotlarla takip edilmiştir. Hemogram ve CRP değerleri 2 haftalık periyotlarla tavşanların kulak veninden kan alınarak incelenmiştir

8 haftalık takip sürecinde 1, 2, 3 ve 6 no'lu tavşanlarda çeşitli dönemlerde enfeksiyon meydana gelmiştir. Enfeksiyon tespit edildiği dönemde gentamisin antibiyotiği 1x1, 3 gün boyunca intramusküler olarak verilmiştir. Enfeksiyon meydana gelen tavşanlarda, makroskobik ve mikroskopik değerlendirilmeler sonucunda çalışma dışı bırakılacak bir durum tespit edilmemiştir (Tablo 5).

Sakrifikasyon işleminden önce yapılan klinik incelemede tavşanların hiçbirinde, kalvarya bölgesinde deri ülserasyonuna, nekrotik kemiğe veya fistül oluşumuna rastlanmazken; iki tavşanda orta hatta kas altında, ekzoftik yapıda fibröz bağ dokusu oluşumu görülmüştür.

Tablo 5. Tavşanlarda serum CRP ve hemogram incelemesi.

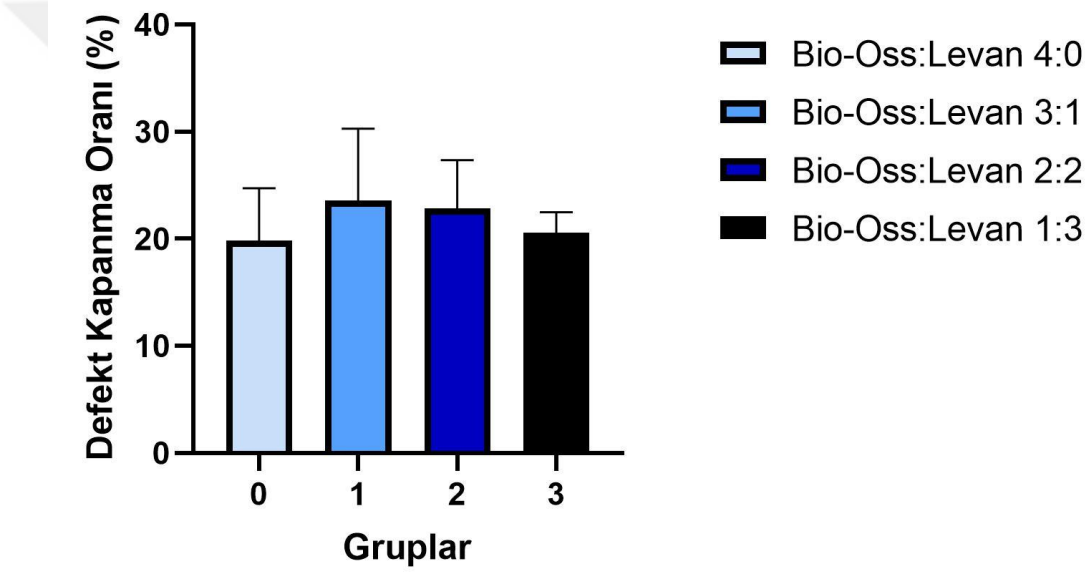
	Preoperatif dönem			Postoperatif 2.hafta		
Hayvan No	**WBC**	**Lenfosit**	**CRP**	**WBC**	**Lenfosit**	**CRP**
1	9,3 x 10^9/L	4,9 x 10^9/L	Negatif	11.7 X 10^9/L	5.7 X 10^9/L	Negatif
2	8,2 X 10^9/L	4,6 x 10^9/L	Negatif	15.7 X 10^9/L	7,5 x 10^9/L	Negatif
3	14,0 X 10^9/L	9,9 x 10^9/L	Pozitif	16,7 X 10^9/L	10,9 x 10^9/L	Negatif
4	8.4 X 10^9/L	5,0 x 10^9/L	Pozitif	10,4 X 10^9/L	5,0 x 10^9/L	Negatif
5	8,5 X 10^9/L	5.2 x 10^9/L	Negatif	13.1 X 10^9/L	6,2 x 10^9/L	Negatif
6	11,7 X 10^9/L	7.2 x 10^9/L	Negatif	12,4 X 10^9/L	6,4 x 10^9/L	Negatif
	Postoperatif 4.hafta			**Postoperatif 6.hafta**		
	WBC	**Lenfosit**	**CRP**	**WBC**	**Lenfosit**	**CRP**
1	10.9 X 10^9/L	5,8 x 10^9/L	Negatif	12.3 X 10^9/L	6,4 x 10^9/L	Pozitif
2	9,5 X 10^9/L	5,7 x 10^9/L	Pozitif	10,8 X 10^9/L	7.6 x 10^9/L	Pozitif
3	16,0 X 10^9/L	10,3 x 10^9/L	Negatif	13,1 X 10^9/L	8,8 x 10^9/L	Pozitif
4	11,3 X 10^9/L	6,5 x 10^9/L	Negatif	13,3 X 10^9/L	8,2 x 10^9/L	Negatif
5	11,5 X 10^9/L	6,2 x 10^9/L	Eser	11,3 X 10^9/L	6,5 x 10^9/L	Negatif
6	15,5 X 10^9/L	10,2 x 10^9/L	Negatif	12,8 X 10^9/L	7,3 x 10^9/L	Pozitif
	Postoperatif 8.hafta					
	WBC	**Lenfosit**	**CRP**			
1	37,6 X 10^9/L	27,7 x 10^9/L	Eser			
2	11,6 X 10^9/L	7,8 x 10^9/L	Negatif			
3	11,1 X 10^9/L	8,3 x 10^9/L	Pozitif			
4	8,6 X 10^9/L	5,2 x 10^9/L	Negatif			
5	6,6 X 10^9/L	4,1 x 10^9/L	Negatif			
6	11,5 X 10^9/L	8,5 x 10^9/L	Negatif			

*Kırmızı renkle boyanmış olan alanlar normalin üstündeki değerleri yani enfeksiyon durumunu ifade etmektedir.

6.2. Doku Örneklerinin Radyolojik Olarak Değerlendirilmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular

6.2.1. Defekt kapanma oranı

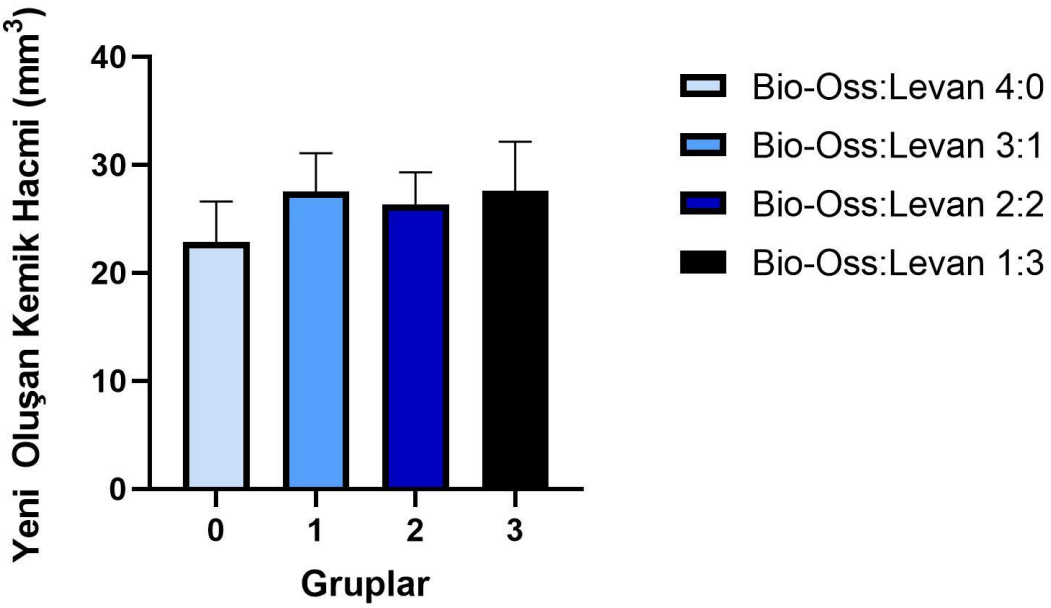
Yeni oluşan kemik hacminin, oluşturulan defekt hacmine oranı ile bulunur, mean ± SEM değeri G0 için 19,85 ± 4,86, G1 için 23,53 ± 6,72, G2 için 22,85 ± 4,49, G3 için 20,55 ± 1,94 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 5).



Şekil 5. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu defekt kapanma oranlarının yüzdesel olarak karşılaştırılması.

6.2.2. Yeni oluşan kemik hacmi

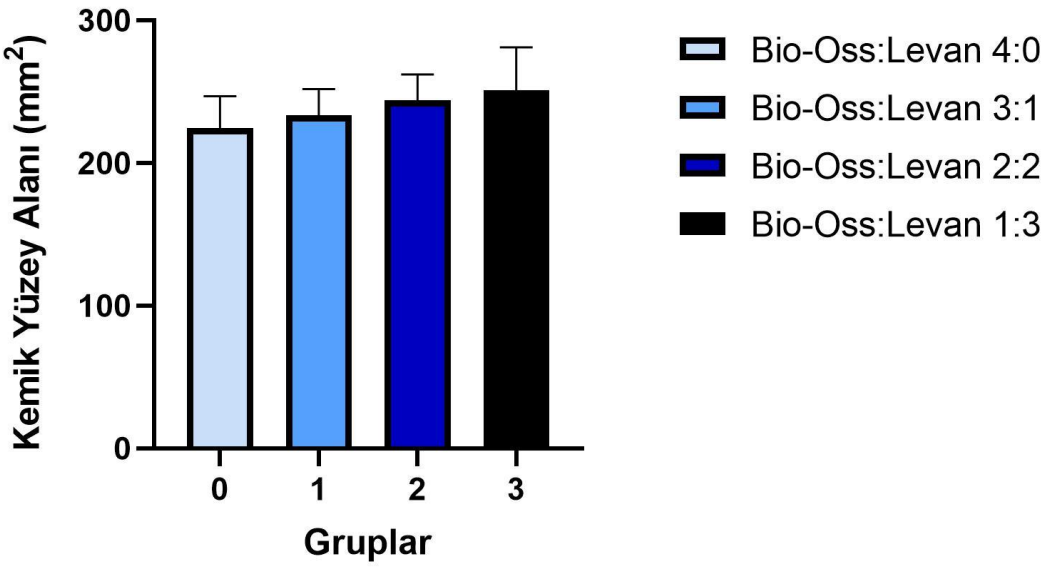
Yeni oluşan kemik hacmi, G0 için 22,89 ± 3,72, G1 için 27,50 ± 3,57, G2 için 26,31 ± 3,01 ve G3 için 27,61 ± 4,52 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 6).



Şekil 6. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu yeni oluşan kemik hacimlerinin karşılaştırılması.

6.2.3. Yeni oluşan kemik yüzey alanı

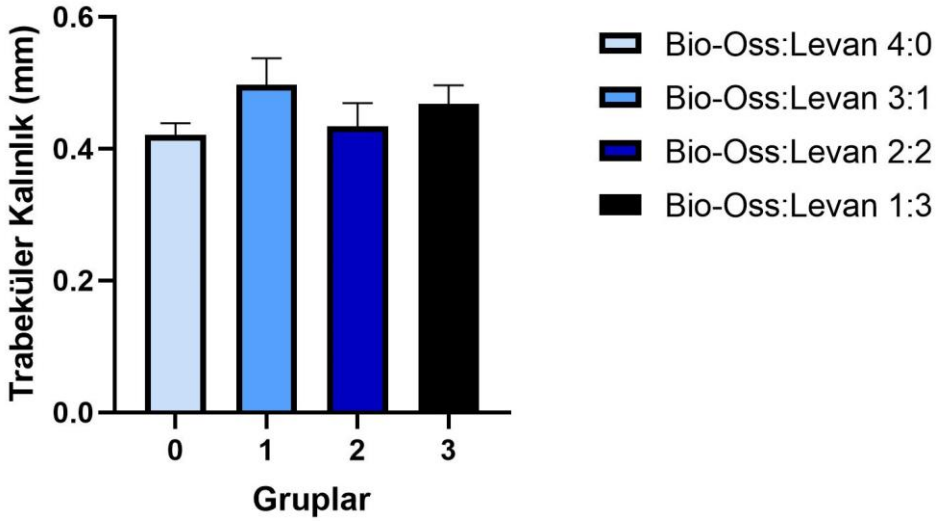
Yeni oluşan kemik yüzey alanı G0 için 224,58 ± 22,38, G2 için 233,73 ± 18,14, G2 için 244,13 ± 17,92 ve G3 için 250,76 ± 30,42 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 7).



Şekil 7. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu yeni oluşan kemik yüzey alanlarının karşılaştırılması.

6.2.4. Trabeküler kemik kalınlığı

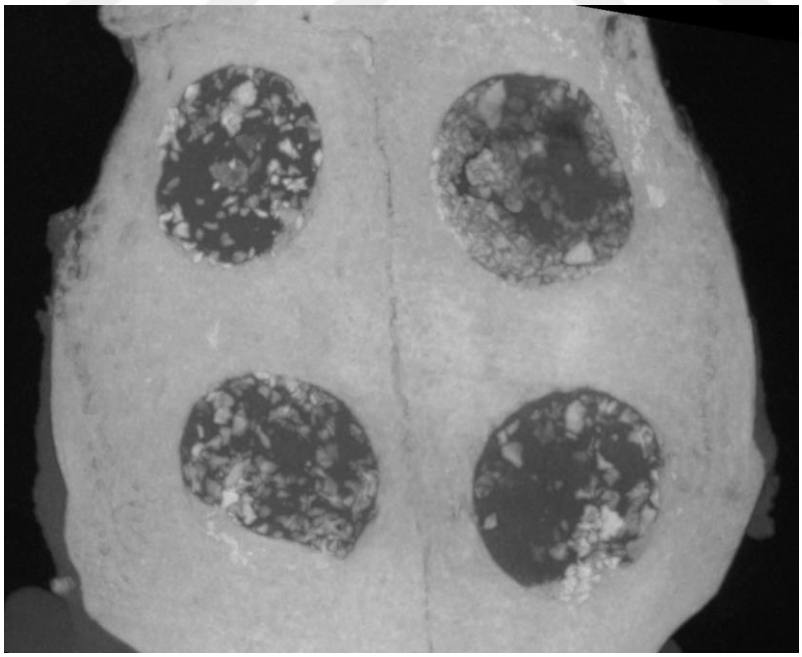
Trabeküler kemik kalınlığı G0 için 0.421 ± 0,017, G1 için 0,497 ± 0,040, G2 için 0,434 ± 0,035 ve G3 için 0,468 ± 0,029 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 8).



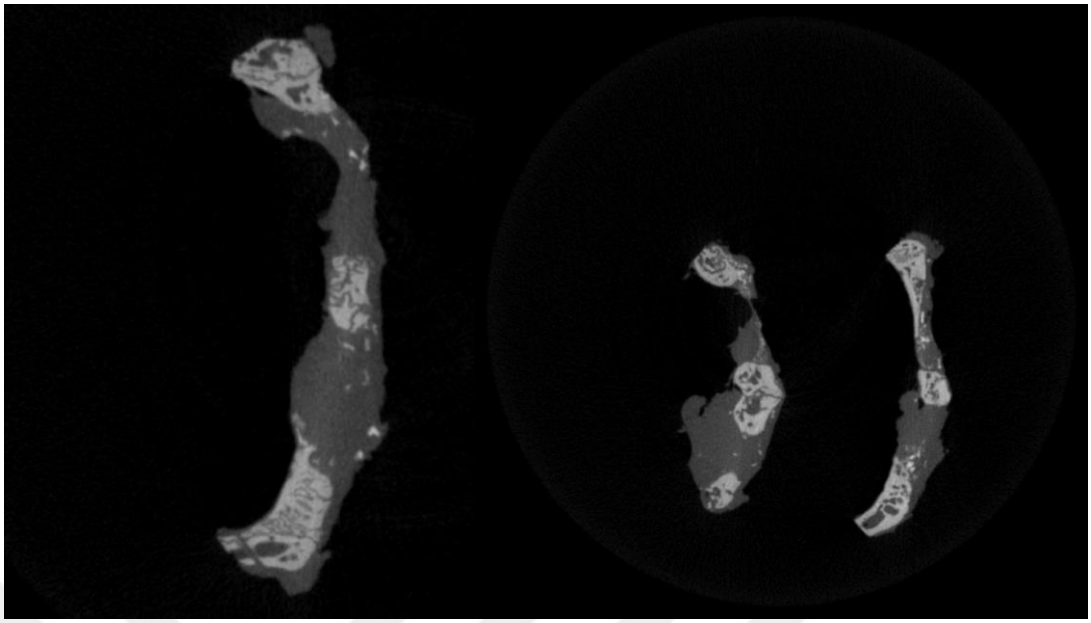
Şekil 8. Grupların mikro-BT incelemesi sonucu trabeküler kemik kalınlığının karşılaştırılması.



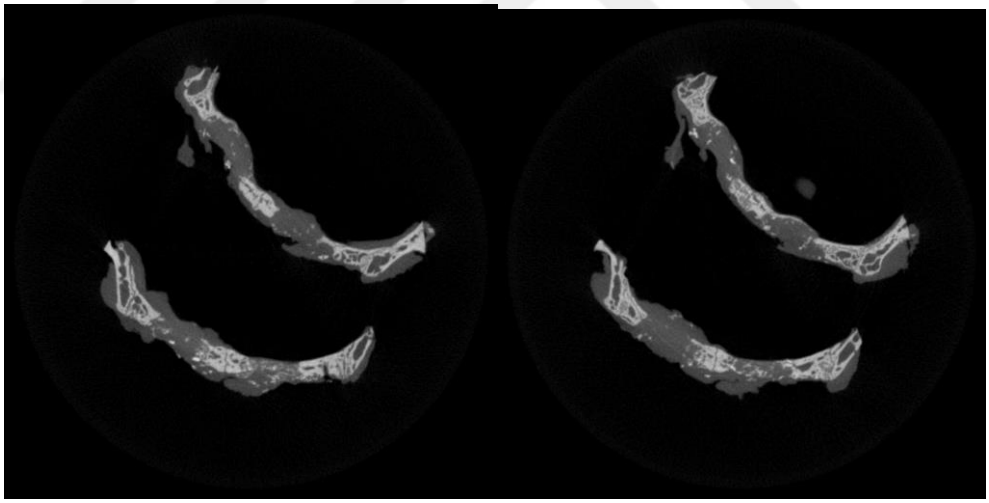
Resim 28. Tavşan kalvaryalarının mikro-BT görünümü.



Resim 29. İyileşme sonrası defektlerin mikro-BT' deki aksiyel kesit görünümü.



Resim 30a ve 30b. Kalvaryal defektlerin mikro-BT'deki sagittal kesit görünümleri.



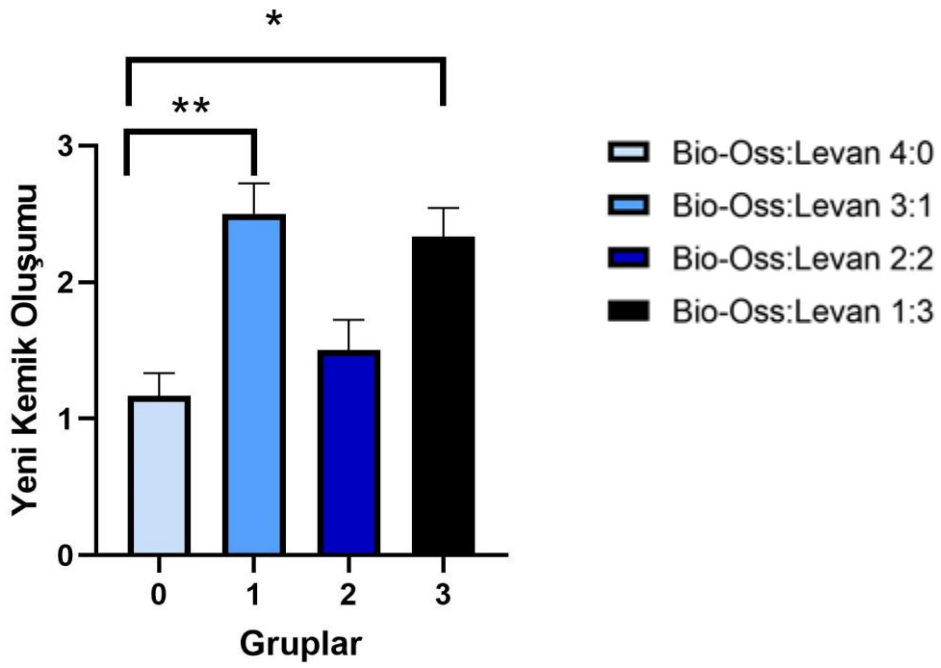
Resim 31a ve 31b. Kalvaryal defektlerin mikro-BT'deki koronal kesit görünümleri.

6.3. Doku Örneklerinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular

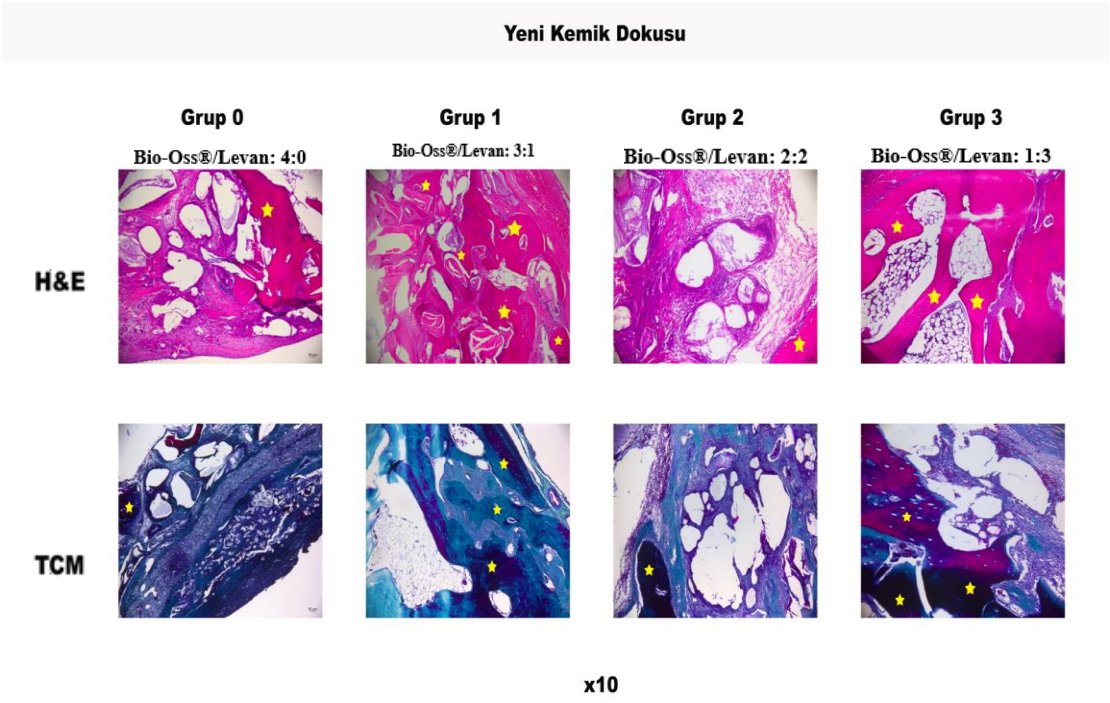
6.3.1. Histopatolojik değerlendirme sonuçları

6.3.1.1. Yeni kemik oluşumu

Tüm gruplar histopatolojik olarak yeni kemik oluşumu skorlaması açısından değerlendirildiğinde G0 için 1,16 ± 0,17, G1 için 2.5 ± 0,22, G2 için 1,50 ± 0,22, G3 için 2,33 ± 0,21 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda G0 ve G1 grupları arasında yüksek derecede anlamlı fark bulunmuştur (**p<0.01). G0 ve G3 grupları arasında da anlamlı bir fark tespit edilmiştir (*p<0.05). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 9).



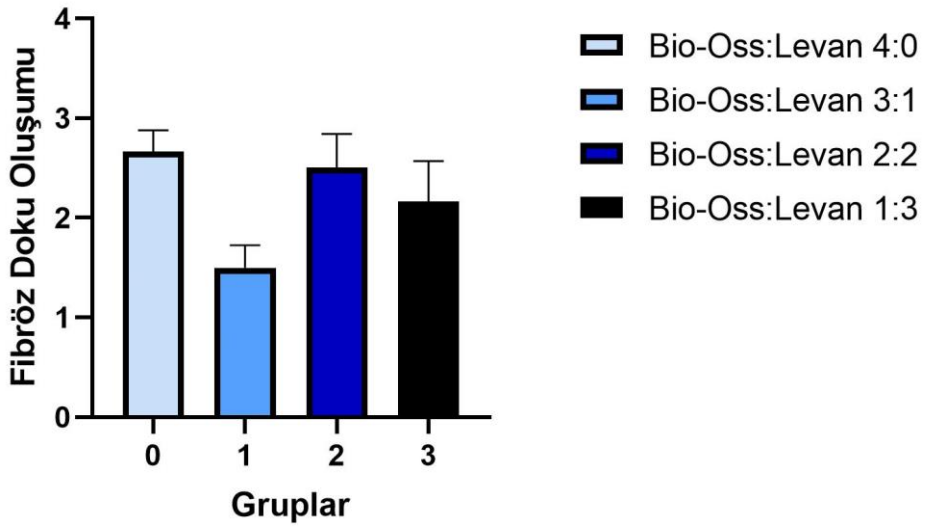
Şekil 9. Grupların yeni kemik oluşum skorlamalarının karşılaştırılması. Grup 0'a göre kıyaslandığında * p<0.05, ** p<0.01.



Resim 32. Grup 0,1,2 ve 3'ün yeni kemik dokusu oluşumunun H&E ve TCM boyanmış kesitler üzerindeki görünümü. Resimlerdeki sarı yıldız kemik alanlarını göstermektedir. Grup 1 ve 3' te defektin oluşturulduğu alanda yeni kemik oluşumları histopatolojik olarak görülmektedir. Kesitler x10'luk büyütme kullanılarak fotoğraflandırılmıştır.

6.3.1.2. Fibröz doku oluşumu

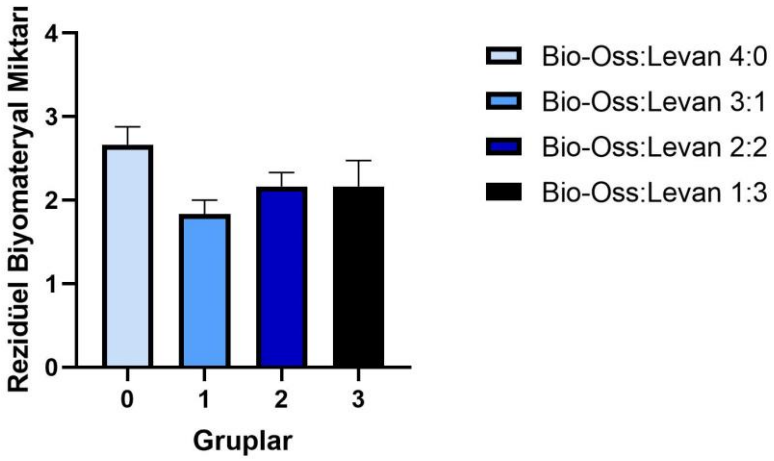
Tüm gruplar histopatolojik olarak fibröz doku oluşumu skorlaması açısından değerlendirildiklerinde G0 için 2,67 ± 0,21, G1 için 1,5 ± 0,22, G2 için 2,5 ± 0,34 ve G3 için 2,17 ± 0,40 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 10).



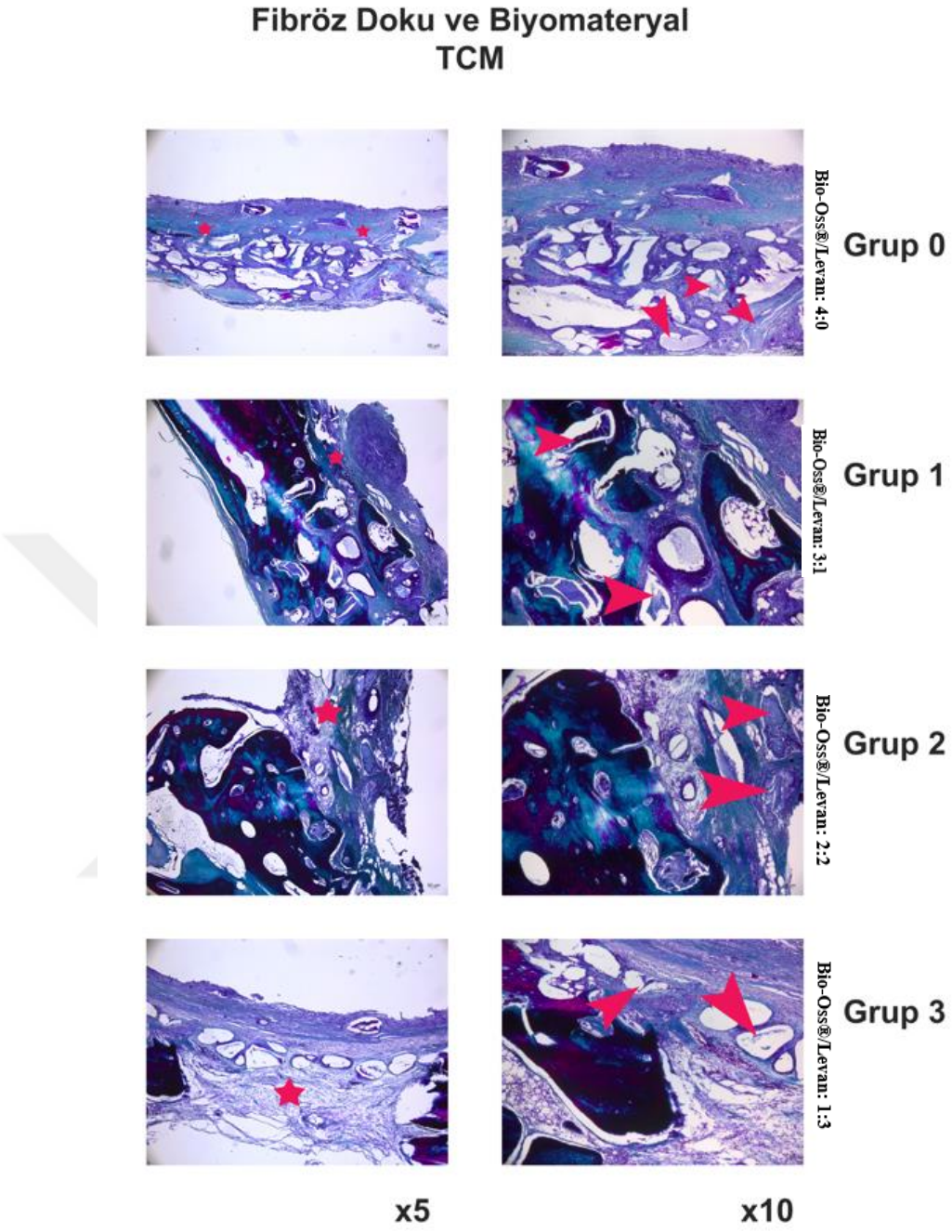
Şekil 10. Grupların fibröz doku oluşumu skorlamalarının karşılaştırılması.

6.3.1.3. Rezidüel biyomateryal

Tüm gruplar histopatolojik olarak rezidüel biyomateryal skorlaması açısından değerlendirildiğinde G0 için 2,67 ± 0,21, G1 için 1,83 ± 0,17, G2 için 2,17 ± 0,17 ve G3 için 2,17 ± 0,31 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05) (Şekil 11).



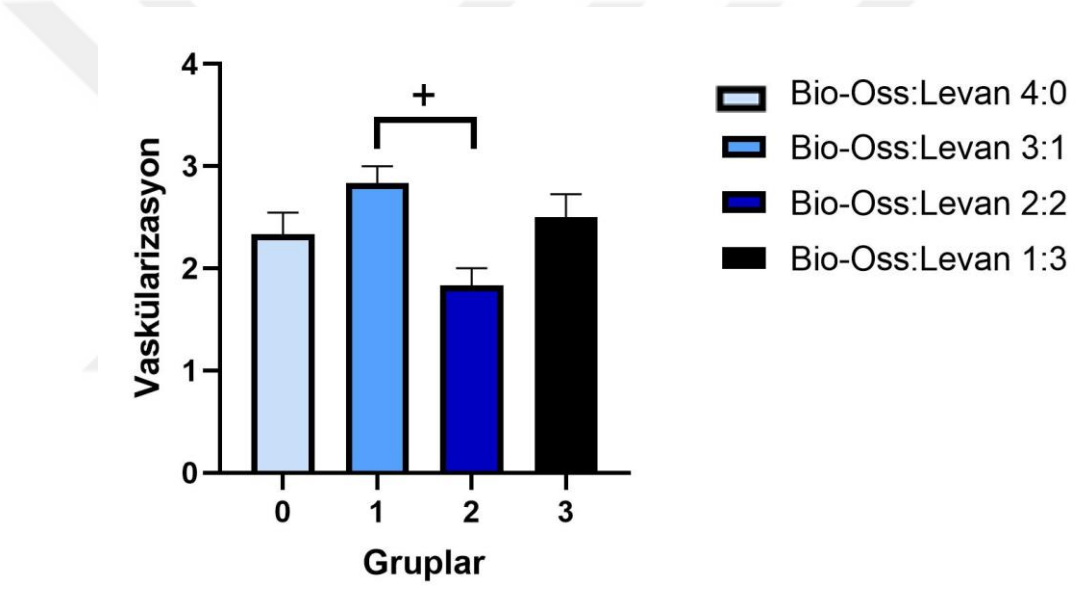
Şekil 11. Grupların rezidüel biyomateryal skorlamalarının karşılaştırılması.



Resim 33. Grup 0,1,2 ve 3'ün fibröz doku ve rezidüel biyomateryal miktarının TCM boyanmış kesitler üzerindeki görünümü. Resimde kırmızı yıldız fibröz bağ dokusu alanlarını, kırmızı ok başları ise biyomateryal yapılarını göstermektedir. Defektin oluşturulduğu bölgede Grup 0'da sadece fibröz bağ dokusu alanları görülürken, Grup 1 ve 3'te defekt alanının kemik ile kaplandığı görülmektedir. Aynı alanda LH varlığı da dikkat çekicidir. Kesitler x5 ve x10'luk büyütme kullanılarak fotoğraflandırılmıştır.

6.3.1.4. Vaskülarizasyon (Yeni damar oluşumu)

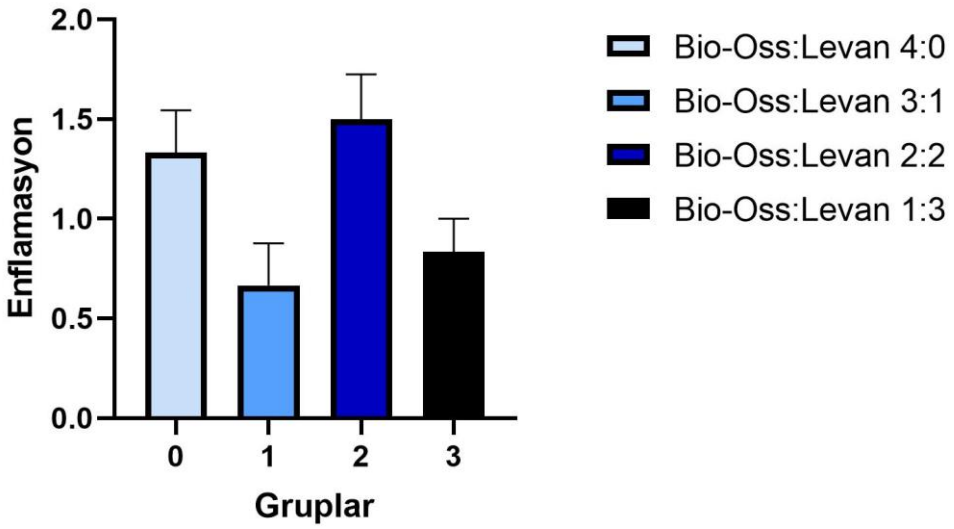
Tüm gruplar histopatolojik olarak vaskülarizasyon skorlaması açısından değerlendirildiklerinde G0 için 1,17 ± 0,17, G1 için 2,5 ± 0,22, G2 için 1,5 ± 0,22 ve G3 için 2,33 ± 0,21 değerleri bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda G1 ve G2 arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilirken ($^{+}p<0.05$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 12).



Şekil 12. Grupların vaskülarizasyon skorlamalarının karşılaştırılması. Grup 1'e göre $^{+}p<0.05$.

6.3.1.5. Enflamasyon

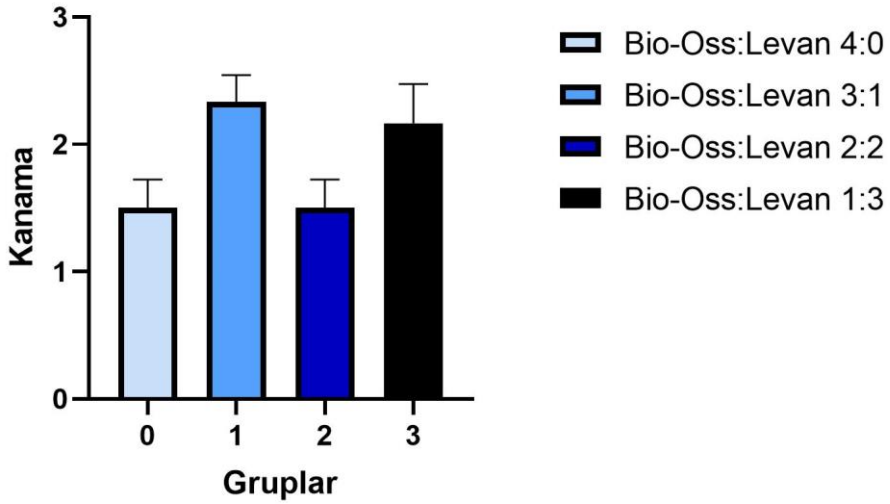
Tüm gruplar histopatolojik enflamasyon skorlaması açısından değerlendirildiklerinde G0 için 1,33 ± 0,21, G1 için 0,66 ± 0,21, G2 için 1,50 ± 0,22, G3 için 0,83 ± 0,17 olarak hesaplanmıştır. Hiçbir grupta şiddetli enflamasyon bulgusuna rastlanmamıştır. G1ve G3'te sadece hafif inflamasyon görülürken, G0 ve G2'de hafif ve orta şiddetli enflamasyon görülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 12).



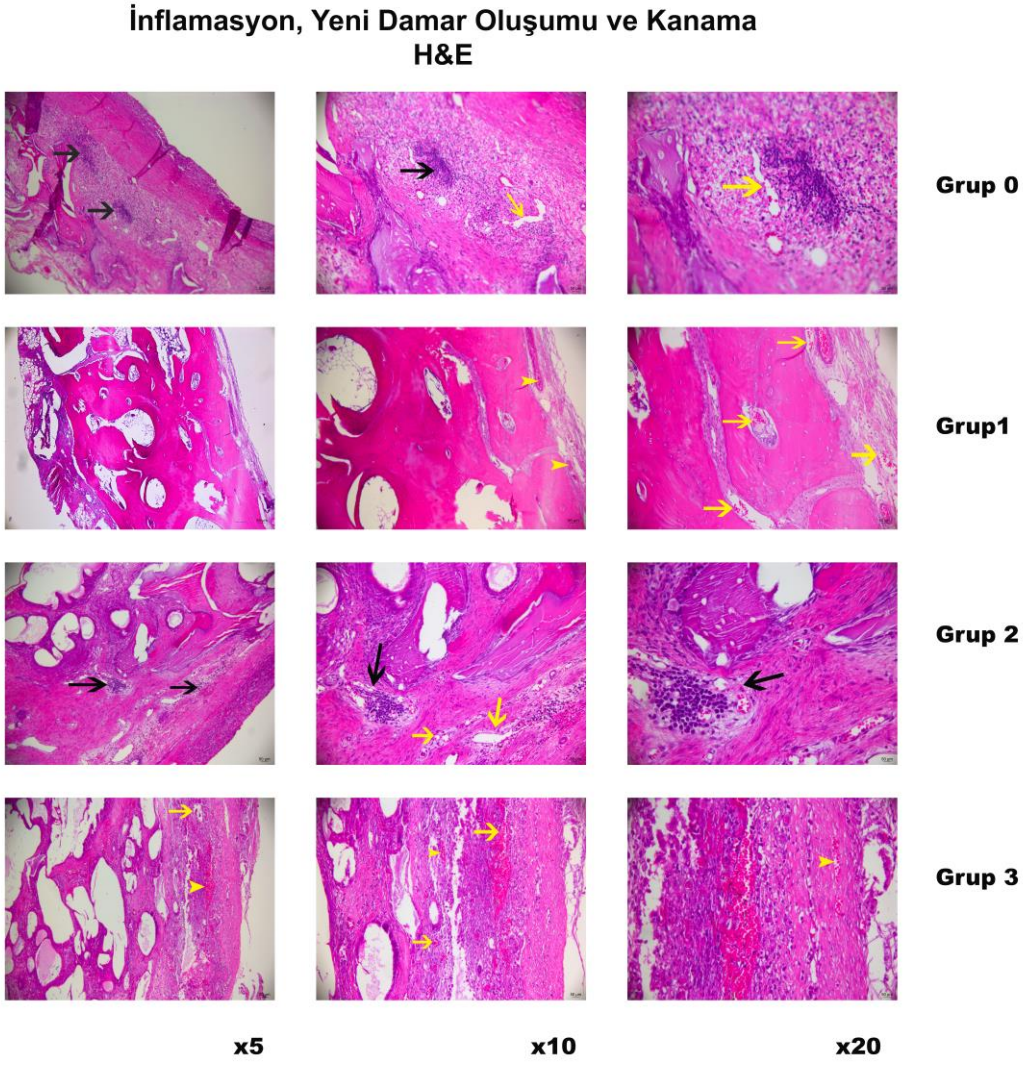
Şekil 13. Grupların enflamasyon skorlamalarının karşılaştırılması.

6.3.1.6. Kanama

Tüm gruplardaki hayvanlar histopatolojik olarak kanama skorlaması açısından değerlendirildiklerinde G0 için 1,5 ± 0,22, G1 için 2,33 ± 0,21, G2 için 1,5 ± 0,22 ve G3 için 2,17 ± 0,33 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05) (Şekil 13).



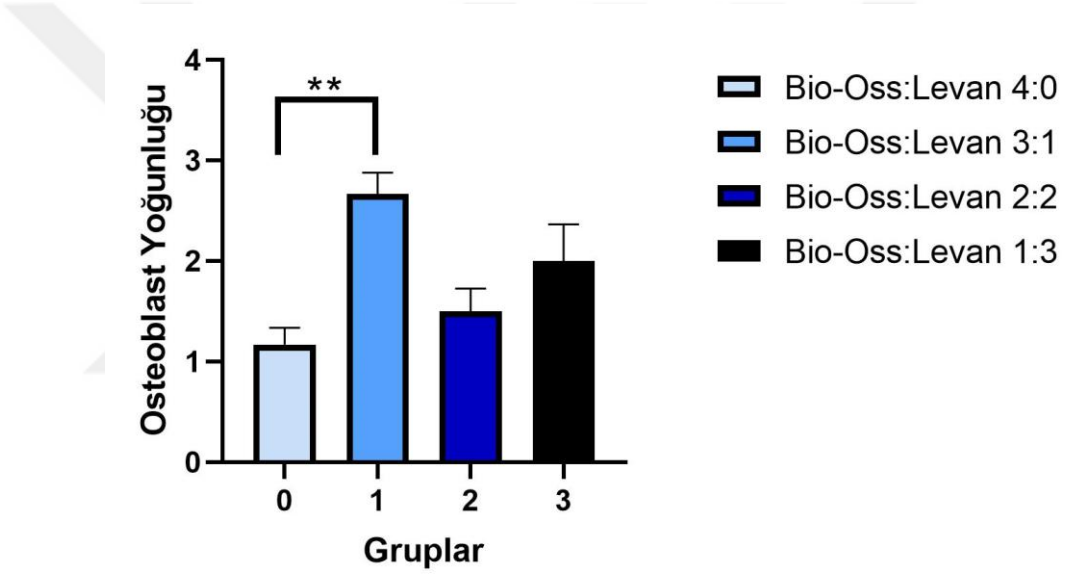
Şekil 14. Grupların kanama skorlamalarının karşılaştırılması.



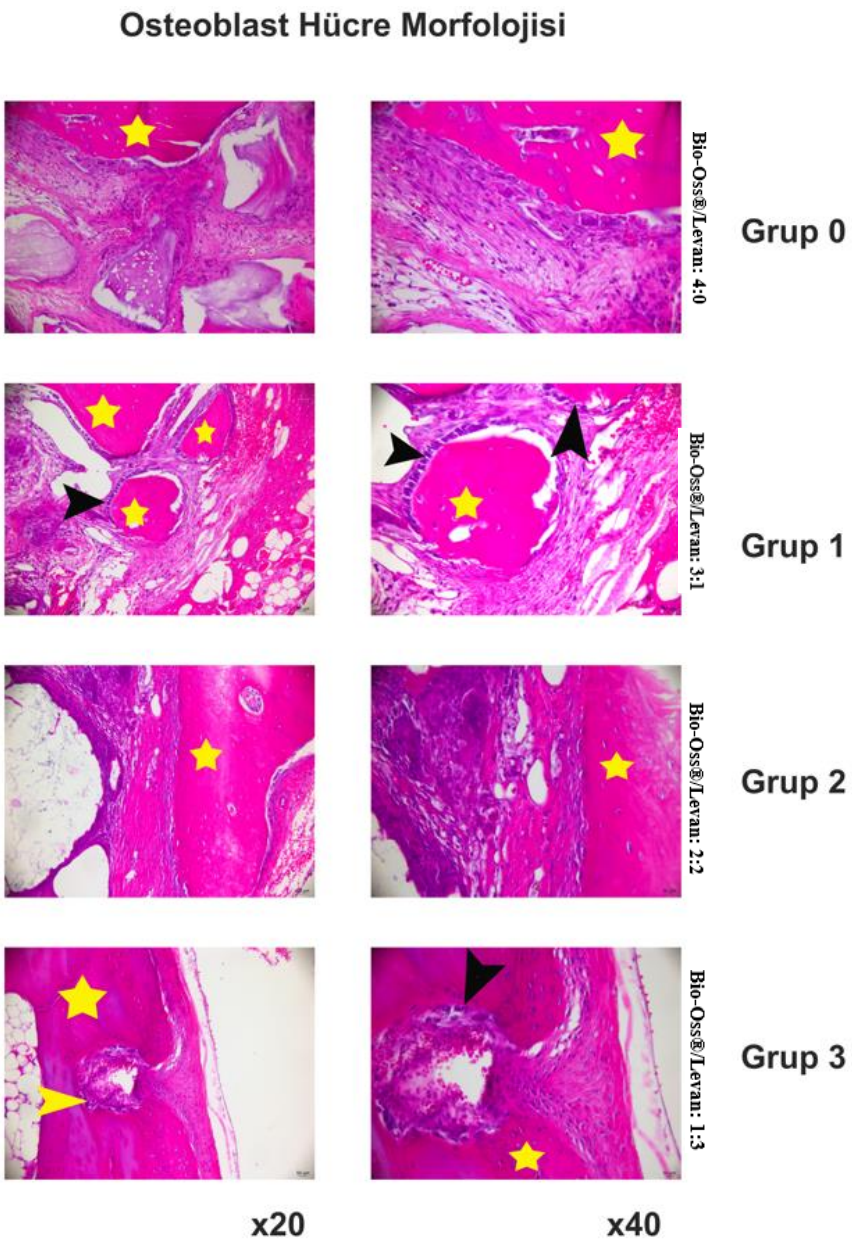
Resim 34. Grup 0, 1, 2 ve 3'ün enflamasyon, yeni damar oluşumu ve kanama durumlarının H&E boyanmış kesitler üzerindeki görünümü. Resimde siyah ok infiltrasyonu, sarı ok yeni damar oluşumu alanlarını, sarı ok başı ise kanama alanlarını göstermektedir. Defektin oluşturulduğu bölgede Grup 0 ve 2'de infiltrasyonun şiddetli olduğu, yeni damar oluşumlarının meydana anlaşılmaktadır. Grup 1 ve 3'te infiltrasyonun bittiğini ve damarların kemik materyalini getirme ile görev aldığı histolojik olarak anlaşılmaktadır. Yeni damarların oluşması hem infiltrasyon hem de kemik materyali için önemli bulgudur. Kesitler x5, x10 ve x20'lik büyütme kullanılarak fotoğraflandırılmıştır.

6.3.1.7. Osteoblast yoğunluğu

Tüm gruplar histopatolojik olarak osteoblast yoğunluğu skorlaması açısından değerlendirilmiştir. G0 için 1,17 ± 0,17, G1 için 2,67 ± 0,21, G2 için 1,5 ± 0,22 ve G3 için 2 ± 0,37 değerleri bulunmuştur. G0 ve G1 arasından istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlılık tespit edilirken (**p<0,01), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) (Şekil 14).



Şekil 15. Grupların osteoblast yoğunluğu skorlamalarının karşılaştırılması**.**

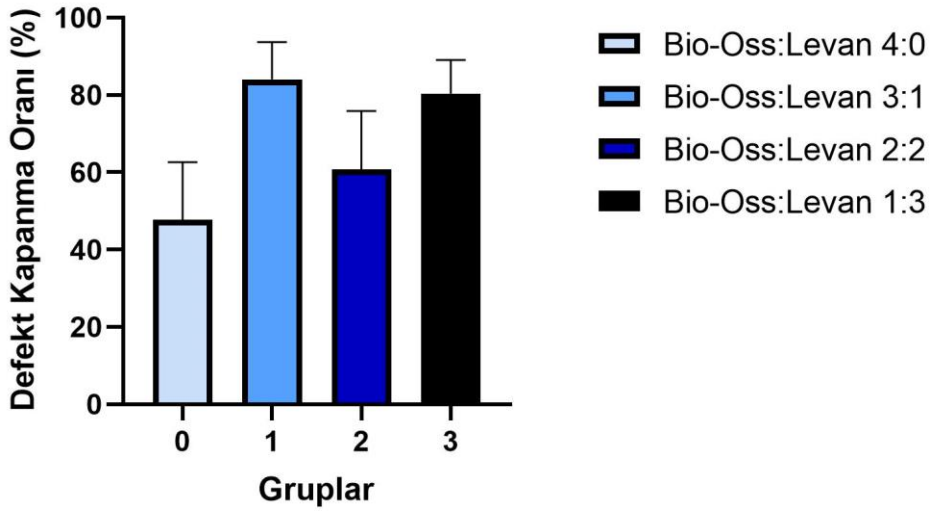


Resim 35. Grup 0, 1, 2 ve 3'ün osteoblast hücre morfolojisi ve yoğunluğunun H&E boyanmış kesitler üzerindeki görünümü. Resimde siyah ok başı osteoblast hücrelerini, sarı yıldız kemik alanlarını göstermektedir. Grup 0 ve 2'de kemik alanlarının defekt bölgesinde yetersiz olduğu gözlemlenmektedir. Grup 1 ve 3'te ise yeni kemik oluşumları ve osteoblastların fazla olması bize defektin kapandığını işaret etmektedir. Kesitler x20 ve x40'lik büyütme kullanılarak fotoğraflandırılmıştır

6.3.2. Histomorfometrik değerlendirme sonuçları

6.3.2.1. Defekt kapanma oranı

Histomorfometrik değerlendirme sonucunda defekt kapanma oranı yüzdesel olarak (%) G0 için 47,67 ± 14,92, G1 için 84,02 ± 9,71, G2 için 60,806 ± 15,09 ve G3 için 80,34 ± 8,73 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05) (Şekil 15).



Şekil 16. Grupların histomorfometrik inceleme sonucu defekt kapanma oranlarının karşılaştırılması

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çene kemik defektleri travmalar, cerrahi olarak iyi huylu tümörlerin veya malign neoplazmaların çıkarılması, konjenital anomaliler, kleftler, kemik hipoplazisi, periodontal enflamasyon, diş abseleri veya çekimi, ilerlemiş yaş veya genel hastalıklara bağlı oluşabilmektedir (Kumar ve ark., 2013). Oluşan kemik defektlerinin ise normal anatomik yapıyı geri kazandırmak, deforme alanın onarılması, estetik restorasyon ve dental implant uygulanması amacıyla rekonstrüksiyonları gerekir (Elgali ve ark., 2017). Çalışmamızdaki hipotezimiz LH'nin YKR'de, literatürde yaygın olarak kullanılan Bio-Oss® ile kombine edilerek defektlere uygulanması sonucunda yeni kemik oluşumu miktarının artırılacağı ve kemikleşme sürecinin hızlandırılacak olmasıdır. Bu sayede yerli bir üretim olan LH'nin kullanılmasıyla ve ithal edilen Bio-Oss® kemik grefti miktarının azaltılmasıyla hastalara tedavi sırasında çıkabilecek maliyetin düşürülebilmesi mümkündür. Araştırma sorumuz ise LH'nin, Bio-Oss® kadar doku uyumu yüksek olan bir biyomateryal olup olmadığının tespit edilmesi ve hangi kombinasyonla en iyi iyileşme ve kemik oluşumu elde edilebilir üzerinedir. Tavşanlarda yapmış olduğumuz *in vivo* çalışmamız sonucunda, radyolojik olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen histopatolojik incelemelerde Bio-Oss®/levan:(3:1) ve (1:3) uygulandığı defektlerde sadece Bio-Oss® uygulanan kontrol grubuna göre yeni kemik oluşumu anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. G1'de osteoblast hücre yoğunluğu ve yeni damar oluşum miktarı anlamlı derecede fazla çıkmıştır. Aynı zamanda gruplar arasında doku enflamasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kemik ogmentasyonu, oral ve maksillofasiyal bölgede meydana gelen defektlerin tedavisinde klinikte rutin olarak uyguladığımız işlemlerden birisidir. Uygulanacak tedavi yöntemi ise defektin yapısına, ihtiyaç olan doku miktarına, hekimin tecrübesine, ihtiyaç olan doku miktarına veya maliyete göre farklılık gösterir. Günümüzde kemik deformasyonlarının tedavisi için blok greftleme, YKR,

distraksiyon osteogenezi, büyüme faktörleri ve kök hücre tedavisi dahil olmak üzere birçok teknik geliştirilmiştir (Titsinides ve ark., 2019). YKR, alveolar kret defektlerinin ogmentasyonu için uzun dönem prognozu iyi olan çok yönlü ve etkili bir tekniktir, aynı zamanda implantın protetik olarak doğru pozisyonda yerleştirilmesi için büyük önem arz etmektedir ve implant uygulamalarının yaklaşık %40'ında YKR operasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Rakhmatia ve ark., 2013; Elgali ve ark., 2017). Biz de çalışmamızda bu sebeplerden ötürü YKR tekniğini tercih ettik.

Biyomedikal araştırmalar, klinikte uygulanabilecek deneysel sonuçlar üretmeyi amaçlar. Bu amaçla yapılan kemik mühendisliği çalışmalarında, travma ya da malignite gibi nedenlerle kaybedilen kemiğin yenilenmesi ve işlevinin eski haline getirilmesi amaçlanır. Kemik mühendisliği çalışmalarında, yeni bir biyomateryal araştırılacaksa önce *in vitro* modeller kullanılır ancak ortamın; damarlanma, hücre ve doku organizasyonu, immün veya enflamatuar yanıt ve iyileşme süreci gibi temel faktörlerden yoksun olması sebebiyle yeterli görülmemiş ve *in vivo* hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmuştur (Ratner ve ark., 2017). Hayvan modelleri; tıp ve diş hekimliğindeki temel keşifler, fizibilite ile birlikte biyoaktivite testi, klinik modelleme ve etkinlik tahmini gibi çalışma alanlarında kritik rol oynar (Muschler ve ark., 2010). *In vivo* araştırmalarda kullanılan hayvan modelleri, kemikle ilgili biyomedikal araştırmalarda kullanılmak üzere, fizyolojik ve patolojik koşullarla ilgili verilerin toplanabilmesine izin verir (Gomes ve Fernandes, 2011). *İn vitro* hücre kültürü çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmesi durumda *in vivo* hayvan çalışmalarına geçilir; öncelikle fare, sıçan ve tavşan gibi evrimsel olarak daha az gelişmiş hayvanlar tercih edilir, burada başarılı sonuçlar elde edilmesi durumunda domuz, koyun, sığır, at ve primatlar gibi daha gelişmiş hayvanlarda çalışma yapılır. Tüm bu sürecin sonunda preklinik çalışmalar tamamlanmış olur ve klinik insan çalışmalarına geçilir.

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu amacıyla literatürde yapılmış olan *in vivo* hayvan çalışmalarında genellikle sıçan ve tavşan tercih edilmiştir (Hämmerle ve ark., 1995; Liu ve ark., 2020; Saulacic ve ark., 2021; Lohmann ve ark., 2017; Özer ve ark., 2022). Kemik dokusunda implantasyon ve biyomateryal testi için tercih edilecek olan türlerle ilgili uluslararası standartlara göre tavşanlar önemli kısmı temsil eder. Sıçan en sık kullanılan modellerden biri olmasına rağmen, kemik bileşimi, iyileşme ve anatomideki önemli farklılıklar nedeniyle implantların, biyomateryallerin ve kemiğin yeniden şekillenmesini test etmek için uygun bir model olarak görülmemektedir (Pearce ve ark., 2007). *İn vivo* çalışmamızda tavşanlarda çalışılmıştır ve kalvarya bölgesinde dairesel defektler oluşturulmuştur (Hämmerle ve ark., 1995; Özer ve ark., 2019; Stumbras ve ark., 2020; Saulacic ve ark., 2017; Altiparmak ve ark., 2020; Chen ve ark., 2019). Bu modeli seçmemizin en önemli nedenleri şunlardır; (1) Tavşanlar altı ay gibi çok kısa bir sürede matürasyonlarını tamamlar (Gilsanz ve ark., 1988). (2) Embriyolojik süreçte tavşan kalvaryası membranöz kemikleşme ile oluşur, bu sebepten ötürü kalvaryal defekt modelleri maksillofasiyal bölgeye çok benzerdir. Kalvaryadaki kortikal kemik, fizyolojik yapısından ötürü atrofik mandibulaya benzetilirken, anatomik olarak da kalvarya, mandibulaya benzer şekilde süngerimsi kemiğin arada kaldığı iki kortikal tabakadan oluşur. (3) Fareler veya sıçanlar gibi küçük hayvanların aksine tavşan kalvaryasında yapılan cerrahiler, daha büyük anatomik boyut nedeniyle çoklu defekt oluşturulmasına izin verecek genişliğe sahiptir bu sayede çalışılmak istenilen tüm materyaller bir tavşanda uygulanabilir ve bireylere bağlı rejenerasyon kapasite farklılıklarından kaynaklanacak gözlemsel hatalar da ortadan kaldırılmış olur (Delgado-Ruiz ve ark., 2015; Castañeda ve ark., 2006). (4) Kalvaryal kemik, uygun radyolojik ve histolojik analize olanak sağlayan tek tip dairesel bir defektin oluşturulmasına izin veren plaka benzeri bir yapıdır (Greenwald ve ark., 2001), (5) Dura ve üstteki deri tarafından sağlanan destek nedeniyle fiksasyon gerekmez (Cypher ve Grossman, 1996), (6) Model iyi çalışılmıştır, kolayca tekrarlanabilir ve çeşitli maddelerinin kesin olarak karşılaştırılmasına izin verir (Giannoudis ve ark., 2005), (7) Sıçanlar, tavşanlara göre gelişmişlik seviyeleri daha düşük olsa da daha az sayıda tavşan kullanılarak aynı etkinlikte sonuçlar elde edilebilmektedir (Liu ve ark., 2020). Ancak sıçanlarda her hayvan için tek bir defekt oluşturulabileceğinden

çok daha fazla sayıda sıçanla çalışmak gerekmektedir (Seno ve Hankenson, 2020; Lucatelli ve ark., 2018; Aroni ve ark., 2019).

Tavşan kalvaryalarında kritik boyut defekti değil de 8mm çapında (Liu ve ark., 2020; Altiparmak ve ark., 2020) kritik olmayan boyut defekti tercih etmemizin sebebi, aynı tavşanda 4 adet defekt oluşturabiliyor olmamızdır. 4 adet defekt oluşturmamızın en önemli sebebi tüm grupların aynı tavşanda oluşturularak bireysel farklılıklardan kaynaklanabilecek olan gözlemsel hataların önüne geçmektir (Queiroz ve ark., 2006; Aghaloo ve ark., 2004; Tovar ve ark., 2014; Yazdi ve ark., 2013; Lee ve ark., 2014; Liu ve ark., 2020; Altiparmak ve ark., 2020). Bu sayede gerçeğe daha yakın veriler elde ettiğimizi düşünmekteyiz. Stumbras ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada, bireysel farklılıkların önüne geçmek için tavşan kalvaryasında 4 adet, 6,5mm çapında sirküler defektler oluşturmuşlardır. Çalışmamızda 8 adet tavşan yer almıştır (Schaller ve ark., 2020), Liu ve ark., 2020 yılında yapmış oldukları çalışmada, tavşan kalvaryalarından 4'er defekt oluşturmuşlar ve oluşturdukları bu defektlere bifazik kalsiyum fosfat (BCP) iskelesini farklı makropor boyutlarında olacak şekilde defektlere uygulamıştır. Radyolojik ve histopatolojik olarak ana sonuç ölçütü, bizim çalışmamızda da olduğu üzere yeni kemik oluşumudur. Örneklem boyutunun hesaplanması için G*Power 3.1.9.4 programı kullanılmıştır. Bu grupların ana sonuç ölçütü olan yeni kemik oluşum yüzdelerinin sırasıyla mean ± standart sapma değerleri *62.64±4.72, 66.25±2.83, 67.82±1.93 ve 70.79± 3,09* olarak bulunmuştur. Alpha değeri *(α)= 0.05, P(1-ß) =0,95* kabul edilip effect size *0,2698601* olarak hesaplanmıştır. Bunun sonucunda anlamlı bir istatistiksel fark bulunabilmesi için her bir grup için örneklem büyüklüğü 6 olmak üzere toplamda 24 olarak hesaplanmıştır ancak tavşanların kalvaryal bölgesinde çalışılacağı için olası ölümler ve çalışma dışı kalma durumları göz önüne alınarak her grup için %20 daha fazla örneklem boyutu hesaplanmıştır. Bu da her grup için 8 totalde 32 tane örneklem büyüklüğüne karşılık gelmektedir (Liu ve ark., 2020).

Literatürde YKR ile ilgili yer alan çalışmaların çoğunda kontrol grubu spontan olarak iyileşmeye bırakılmıştır ve etkisi incelenmek istenen biyomateryal, defektlere tek başına uygulanmıştır. Stumbras ve arkadaşları, ADSC ve PRGF'nin, ksenojenik kemik greftiyle (BBM) kombine olarak uygulanması sonucunda YKR'deki kemik oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Yapılmış olan histomorfometrik analizler sonucunda yeni kemik oluşum miktarı post-op. 2.haftada, BBM/ADCs/PRGF grubunda kontrol ve BBM grubuna göre anlamlı derecede fazla çıkmıştır ancak BBM/PRGF grubu ile arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır. Post-op 4. ve 8. haftalarda ise yeni kemik oluşumu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır. Kemik – biyomateryal temas alanı incelendiğinde ise post-op. 2. hafta sonunda, BBM/PRGF grubunda BBM ve BBM/ADSCs grupları ile arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ancak post-op. 4 ve 8. haftalarda gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Spontan olarak iyileşmeye bırakılan kontrol grubu ile sadece ksenojenik kemik greftinin uygulandığı BBM grubunda yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Stumbras ve ark., 2020). Bu veriler ışığında çalışmamızda, kontrol grubu spontan iyileşmeye bırakılmamış onun yerine Bio-Oss® defekte tek başına uygulanmıştır. Literatürde yapılmış olan birçok çalışmada da kontrol grubu spontan iyileşmeye bırakılmamıştır (Özer ve ark., 2017; Altiparmak ve ark., 2020). Levanın boyutsal stabilitesi Bio-Oss® kadar yeterli olmadığından, çalışmamızdaki gruplardan biri tek başına LH ile oluşturulmamıştır.

Levan hidrojelinin, Bio-Oss® ile *in vitro* çalışması yapılmış olsa da daha önce *in vivo* çalışması yapılmadığı için net etki kombinasyonu bilinmemektedir. Bu sebepten ötürü Bio-Oss®:Levan; 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 olacak şekilde dört farklı kombinasyon uygulanmıştır. Buna benzer uygulama literatürde de yer almaktadır. Saulacic ve arkadaşları, net etki dozlarını bilmedikleri biyomimetik HA (Hidroksiapatit) ve alfa trikalsiyum fosfat (α-TCP) biyomateryallerini üç farklı kombinasyonda oluşturup çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Kontrol grubu spontan iyileşmeye bırakılırken, 3 adet çalışma grubu; 3%:97% HA:α-TCP (BBCP1), 12%:88% HA:α-TCP (BBCP2), and 23%:77% HA:α-TCP (BBCP3) olacak şekilde dizayn edilmiştir. Radyolojik incelemeler sonucunda gruplar arasında yeni kemik oluşumu (NB) ve rezidüel

materyal hacmi (RMV) açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Histomorfometrik olarak 3. hafta sonunda defekt kapanma oranı, çalışma gruplarında kontrol grubuna göre daha fazla çıkarken, kendi aralarından yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunmamıştır. 3 ay sonunda yapılan histomorfometrik incelemelerde BBCP1 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yeni kemik oluşumu tespit edilmiştir. (Saulacic ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda da Bio-Oss®:levan kombinasyonunun 3:1 ve 1:3 olduğu G1 ve G3 gruplarında sadece Bio-Oss®'un uygulandığı kontrol grubuna göre histopatolojik olarak yeni kemik oluşumu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda G1 grubunda osteoblast yoğunluğu ve yeni damar oluşumu anlamlı derecede fazla çıkmıştır. Bu veriler ışığında en etkili kombinasyonun (3:1) olduğu anlaşılmaktadır. Yaptığımız farklı doz kombinasyonları sayesinde kemik oluşum sürecini en iyi etkileyecek oranı tespit etmiş bulunmaktayız.

Çok uzun yıllardır sürdürülen çabalara rağmen mükemmel kemik rekonstrüksiyon materyali henüz geliştirilememiştir. Bu amaç için yapılan çok sayıda laboratuvar çalışması olmakla birlikte ancak az sayıda klinik çalışma yapılabilmektedir. Bu durumun önemli nedenlerinden biri kraniyo-maksillofasiyal uygulamalardaki kemik greftlerinin maliyet marjıdır. Maliyetlerin yüksekliği biyomateryal pazarını karmaşık ve pahalı üretim süreçleri nedeniyle sınırlandırmaktadır. Sonuç olarak günümüzde sadece birkaç kemik grefti, kraniyo-maksillofasiyal pazarı domine etmektedir. Bununla birlikte, daha yüksek biyoaktivite ve mekanik dayanıma sahip, uygun maliyetli yöntemlerle imal edilen yeni nesil biyomateryallere artan bir talep vardır (Haugen ve ark., 2019). Ayrıca kemik, yaralanma sonucu rejenerasyon yeteneğine sahip, şekil ve işlevini yeniden kazanabilen, iyileşme kapasitesi yüksek bir dokudur. Bununla birlikte büyük defektlerin sadece doğal sürecine bırakılarak iyileşmesi mümkün değildir. Bu durum nedeniyle biyomateryaller üzerine yapılan çalışmalar, oral ve maksillofasiyal cerrahiyle birlikte diğer birçok tıp branşında büyük ilgi görmektedir. 2019 yılındaki bir sistematik derlemede, ksenogreftler ile otogreftler karşılaştırılmış ve yeni kemik oluşumu, osteokondüksiyon ve rezorpsiyon direnci gibi özellikleri sebebiyle ksenogreftlerin de çok iyi sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir ve en sık kullanılan sığır kaynaklı kemik greftinin Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) olduğu da ifade edilmiştir (Shamsoddin ve ark., 2019), bu

sebepten ötürü ve literatürde de birçok kez kullanıldığı üzere (Chen ve ark., 2019; Saulacic ve ark., 2017; Stumbras ve ark., 2020) bizim çalışmamızda da Bio-Oss® ksenojenik kemik grefti kullanılmıştır.

Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü IBSB araştırma grubu 2008 yılından bu yana HS halofilik bakterileri tarafından üretilen levanın farklı kullanım alanları üzerine yoğunlaşmıştır. HL üzerinde yapılan çalışmalarda bu materyalin, antioksidan, heparin mimetik (Erginer ve ark., 2016) özellikler göstermesiyle dokudaki kanlanmayı artırabileceği düşünülmüştür. Oksitlenmiş levan çevresinde hücresel proliferasyonun çok yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (Axente ve ark., 2014; Sima ve ark., 2011) ve kemik rejenerasyonunda görev alan osteoblast ve anjiyoblast hücrelerinin iyileşme bölgesinde yoğunlaşması bu durum için önemli bir avantaj olarak görülmüştür. Levanın hasarlı doku iyileşmesinin anahtar adımlarından biri olan, metalloproteinaz aktivasyonunda da rol aldığı (Sturzoiu ve ark., 2011) ve antioksidan (Erginer ve ark., 2016) özellik göstermesinden ötürü doku iyileşmesinde kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmüştür. İlk olarak bir çalışmada *Bacillus subtilis* kaynaklı metakrilatlanmış levan türevlerinden foto-çapraz bağlama yöntemi ile çeşitli hidrojeller üretilmiş ve jellerin mekanik özellikleri, biyobozunurlukları ve biyouyumlulukları, LH'nin yeni bir tür fonksiyonel biyomalzeme olma potansiyeli gösterdiğini ortaya koymuştur (Berg ve ark., 2018). Ayrıca lazerle desteklenmiş nanoyapılı biyoaktif yüzeyler (Axente ve ark., 2014) yapışkan ve çok tabakalı film yapısı (Costa ve ark., 2013) ile sıcağa duyarlı hidrojeller (Osman ve ark., 2017) ve doku mühendisliği uygulamaları (Avsar ve ark., 2018; Sezer ve ark., 2017) gibi birçok değerli alanda fonksiyonel materyal olarak kullanılabilir olduğu gösterilmiştir.

Levanın hücre adezyonu ve hücre proliferasyonunu olumlu yönde etkilediğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Toksoy Öner vd., 2016). Bunlardan bazılarını özetleyecek olursak; düşük molekül ağırlıklı levan, poli(ε-kaprolakton) (PCL) ve jelatin 3D doku iskelesi ile yapılan çalışmada insan osteoblast hücrelerinin (Hob) artan levan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre adezyonu ve canlılık sonuçlarında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Duymaz ve ark., 2019**).** Axente ve ark., (2014) oksitlenmiş levan ve modifiye edilmemiş levanın kombine kullanıldığı film

yüzeylerin SaOs2 osteoblast hücrelerinin ERK sinyallenmesini arttırdığını göstermişlerdir. Hasirci ve ark., (2006) levan temelli nanokompozitlerin kemik greftlerin yapısında destekleyici olarak kullanmışlardır. Cam nanopartiküller ile metakrilatlı levan hidrojelinin SaOs2 osteoblast hücrelerinin adezyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (Leite ve ark., 2014). Bu verilerden yola çıkarak çalışmamızda, YKR amacıyla LH kullanılmıştır ve daha önce maksillofasiyal cerrahide kemik rejenerasyonuyla ilgili yapılmış olan *in vivo* çalışması bulunmamaktadır. Bu sebepten ötürü literatüre yapacağı katkılar açısından oldukça özgün bir çalışmadır.

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalarda birçok farklı greft materyali kullanılmıştır. Özer ve arkadaşları 2019 yılında ksenogreft ile tek doz teriparatid (PTH 1-34) kombinasyonunu tavşan kalvaryasında oluşturdukları defektlere uygulamışlardır. Kontrol grubuna tek başına ksenogreft, çalışma grubuna ise ksenogreft ve (PTH 1-34) uygulanmıştır. Histomorfometrik incelemeler sonucunda, post-op. 4.haftada gruplar arasında anlamlı fark bulunmamışken, 8.haftada PTH 1-34 grubunda yeni kemik oluşumu anlamlı derecede fazla çıkmıştır. Defektleri radyolojik olarak incelediklerinde ise 4. ve 8. haftada yeni kemik oluşumu PTH 1-34 grubunda anlamlı derecede fazla çıkmıştır. Çalışma grubunda daha fazla yeni kemik oluşumu elde edilmesinin en önemli sebeplerinden biri olarak PTH 1-34'ün osteoblastik aktiviteyi artırması düşünülebilir (Özer ve ark., 2019). Özer ve arkadaşları 2022 yılında ise ksenogreft ile denosumab kombinasyonunu, tavşan kalvaryasında oluşturdukları defektlerde incelemişlerdir. Hem histomorfometrik hem de radyolojik incelemeler sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ve denosumabın yeni kemik oluşumu üzerine doğrudan bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Özer ve ark., 2022). Lohmann ve arkadaşları 2017 yılında sıçan kalvaryalarında yapmış oldukları çalışmada Arcgel ile otojen ve Bio-Oss® kemik greftlerini farklı defektlere uygulayarak radyolojik ve histomorfometrik olarak sonuçları karşılaştırmışlardır. Hem radyolojik hem de histomorfometrik olarak Arcgel kullanılan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yeni kemik oluşumu tespit edilmiştir (Lohmann ve ark., 2017). Lohmann ve arkadaşları tarafından ArcGels'in işlevselliğini, ilk olarak kök hücre kültüründe (Engler ve ark., 2006)

tanımlanan bir fenomen olan yerel elastikiyetin kontrolü (Neffe ve ark., 2015) ile hücre farklılaşmasını desteklemesi ve ayrıca bozunma fazı sırasında gözenek büyümesiyle hücrelerin mekanik olarak uyarılmasıyla açıklanmıştır. Bu çalışmada hidrojel kullanılması bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunun en önemli kısımlarından biri membran uygulamasıdır. Membran, bağ dokusu hücrelerinin defekt ve kemik grefti içine invazyonunu engelleyerek kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücrelerinin proliferasyonuna uygun ortamı oluşturur. Aynı zamanda defekt içine uygulanan biyomateryalin stabilizasyonuna katkı sağlar (Rakhmatia ve ark., 2013). Literatürdeki çalışmalardan bazılarında biyomateryal uygulanmış defektlerin üzerine yavaş rezorbe olabilen kolajen membran örtülürken (Özer ve ark., 2019; Özer ve ark., 2022; Altiparmak ve ark., 2020); bazı çalışmalarda bu işlem gerçekleştirilmemiştir (Saulacic ve ark., 2021; Stumbras ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda ise biyomateryaller uygulandıktan sonra her bir defektin üzeri Bio-Gide® kolajen membran ile örtülmüş ve titanyum pinler ile sabitlenmiştir. Özellikle LH, serum ve kan ile temas ettiğinde şişme kinetiği gösterdiğinden ötürü, biyomateryallerin birbirine karışmaması açısından bu aşama oldukça önemlidir. Aynı zamanda kolajen membranın pinlerle fiksasyonu An ve arkadaşlarının 2022 yılında yapmış oldukları çalışmada da görüldüğü üzere, defekt boş bırakılsa bile, standart olan kemik grefti ve membran uygulamasına benzer şekilde osteojenik hücre potansiyelini artırdığı ve kemik oluşumunu desteklediği bilinmektedir (An ve ark., 2022).

Yeni kemik oluşumu miktarını ölçmek için en çok tercih edilen yöntemler histomorfometrik analiz ve mikro-BT analizidir. Ancak histomorfometrik analizde, mikro-BT'ye kıyasla daha geniş kesitte segmentler incelenir. Bu nedenle mikro-BT analizinin dahil edildiği çalışmalarda daha doğru ve detaylı sonuçlar elde edilmektedir (Deluiz ve ark., 2015). Ayrıca mikro-BT ile incelenen örneklerde bozulma olmadığı için histomorfometrik analiz yapılabilmektedir. Literatüre baktığımız zaman çoğu çalışmada da olduğu üzere (Özer ve ark., 2022; Özer ve ark.,

2019; Gomes ve Fernandes, 2011; Lohmann ve ark., 2017; Saulacic ve ark., 2021) histopatolojik ve histomorfometrik incelemeler öncesi mikro-BT ile defektlerin üç boyutlu incelemesi gerçekleştirilmiştir. Stumbras ve arkadaşları ile Kim ve arkadaşları ise mikro-BT incelemesi yapmamış sadece histopatolojik ve histomorfometrik inceleme gerçekleştirmişlerdir (Stumbras ve ark., 2020; Kim ve ark., 2016). Çalışmamızda, literatürde yapılan çalışmaların ışığında verilerin daha doğru değerlendirilebilmesi amacıyla önce mikro-BT incelemesi ve daha sonra histopatolojik ve histomorfometrik inceleme gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda histopatolojik incelemeler sonucunda yeni kemik oluşumu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuş olmasına rağmen bu fark radyolojik incelemelerde görülmemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak YKR sonrası defektlerdeki iyileşmenin en doğru şekilde değerlendirilebilmesi açısından histolojik incelemelerin yanında muhakkak radyolojik incelemeler de yapılmadır.

Çalışmamızda YKR'de kullanılan kemik grefti (Bio-Oss®) ile levan hidrojeli farklı oranlarda (3:1, 2:2, 1:3) kombine edilmiştir ve sekiz haftalık takip süreci tamamlanmasıyla birlikte grupların önce mikro-BT incelemeleri gerçekleştirilmiş ve radyolojik olarak defekt kapanma oranı, yeni oluşan kemik hacmi, yeni oluşan kemik yüzey alanı ve trabeküler kemik kalınlığı incelenmiştir. Bu dört veri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). Bunun sebebi geç dönem 8 hafta kemik iyileşmesinin beklenmesi olabilir. Stumbras ve arkadaşları 2020 yılında yapmış oldukları çalışmada defektlerdeki iyileşmeyi 2, 4 ve 8. haftada incelemişlerdir. Kritik boyutta olmayan kemik defektlerinde 2. haftada yani erken iyileşme döneminde yeni kemik oluşumu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken, 4. ve 8. haftada ise gruplar arasında anlamlı bir fark tespit görülmemiştir (Stumbras ve ark., 2020). Radyolojik olarak gruplar arasında anlamlı bir fark çıkmamış olsa da aslında bu sonuç bize Bio-Oss® miktarı azaltılıp LH kullanıldığı durumlarda da aynı etkiyi elde edebildiğimizi göstermektedir.

Çalışmamızın mikro-BT incelemesi tamamlandıktan sonra, histopatolojik ve histomorfometrik incelemelere geçilmiştir. Histopatolojik olarak; yeni kemik oluşumu, fibröz bağ dokusu oluşumu, yeni damar oluşumu, kanama, osteoblast yoğunluğu, enflamasyon ve rezidüel biyomateryal parametreleri incelenmiştir. İncelemeler sonucunda; fibröz bağ dokusu oluşumu, kanama, enflamasyon ve rezidüel biyomateryal parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Özellikle LH'nin dahil edildiği gruplarda, kontrol grubuna göre enflamasyon açısından anlamlı bir farkın olmaması oldukça önemli bir veridir çünkü doku uyumunun, uzun yıllardır literatürde başarıyla kullanılan Bio-Oss® gibi iyi olduğunu göstermektedir. Bio-Oss® ve LH'nin farklı oranlarda uygulanmalarına rağmen rezidüel biyomateryal miktarı açısından incelendiklerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmaması, bu iki biyomateryalin benzer rezorpsiyon hızlarına sahip olduklarını düşündürmektedir. Yeni kemik oluşum miktarı parametresi incelendiği zaman; G1 (Bio-Oss: Levan 3:1) ve G3 (Bio-Oss: Levan; 1:3)'te, G0 (Bio-Oss: Levan; 4:0)'a göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak hem yapmış olduğumuz hem de daha önce yapılmış olan *in vitro* çalışmalarda gösterildiği üzere (Axente ve ark., 2014; Sima ve ark., 2011), levan çevresinde hücresel proliferasyonun çok yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. *İn vitro* öncü çalışmamızda da görüldüğü üzere (Tablo 1) Bio-Oss®, LH ile kombine edildiği zaman hem kemik greftleri hem de hidrojellerin çevresinde daha fazla osteoblast inkübasyonu meydana gelmektedir. Kemik rejenerasyonunda görev alan osteoblast ve anjiyoblast hücrelerinin iyileşme bölgesinde yoğunlaşması önemli bir avantaj olarak görülmüştür. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Başarılı kemik oluşumu için en önemli faktörlerden biri hızlı neovaskülarizasyondur (Saad ve ark., 2015). Vaskülarizasyon (yeni damar oluşumu) parametresi incelendiğinde; G1'de, G2 (Bio-Oss: Levan; 2:2)'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yeni damar oluşumu, kemikleşme sürecinde osteoblast hücreleri, büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerinin bölgeye göçünün artırılmasını sağlayan çok önemli bir faktördür, aynı zamanda enflamasyon yani iyileşme sürecini başlatacağından, ne kadar hızlı gerçekleşirse iyileşme de doğru orantılı olarak o kadar hızlı olacaktır. İyileşme bölgesindeki osteoblast yoğunluğu parametresi

incelendiğinde; G1'de G0'a göre osteoblast hücrelerinin yoğunluğu anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Histomorfometrik olarak defekt kapanma oranı parametresi incelenmiş ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu çalışmanın doğasında var olan çeşitli sınırlamalar söz konusudur. Tavşanların kalvaryal defekt modeli, kemik oluşumu çalışmalarında yaygın olarak uygulansa da bu model, sınırlı alan nedeniyle, YKR tekniklerinin klinik durumunu tam olarak taklit edemez. Bu bir pilot çalışmadır ve örneklem boyutu küçüktür. Çalışmada, kritik boyutta olmayan dört adet kalvarial kemik defekti (8mm) oluşturulmuştur ve erken dönem kemik iyileşmesi incelenmemiştir. Cerrah tarafından oluşturulan kalvarial defektlerde, kemik rejenerasyonunu destekleyen şekilde kontrol altında tutulabilirken, günlük klinik senaryolar genellikle daha zorlu, kontrol altına alınmamış veya kombine kemik defektleri söz konusudur. Levan hidrojeli, serum ve kanla temas ettiğinde yüksek oranda şişme kinetiği gösteren bir biyomateryaldir. Bu özelliği defekte uygulanması sırasında manipülasyonunu oldukça zorlaştıran bir faktördür. İlerleyen dönemlerde, kemik rejenerasyonun inceleneceği çalışmalarda sinüs lifting işlemi gibi daha kapalı bir defekt ya da titanyum silindirler gibi özel malzemelerle çalışmak daha uygun olabilir. İmmünohistokimya stereolojik inceleme, hücre canlılığı testi, DNA izolasyonu ve genomik analiz gibi deha detaylı analizler çalışmaya dahil edilebilir. Bu çalışma *in vivo* hayvan çalışmalarının ilk aşamasıdır. Bundan sonraki süreçte klinik faz çalışmalarına geçilmeden önce daha gelişmiş hayvanlarda (koyun, sığır, at, domuz ve primat gibi.) bu çalışmaların devam ettirilmesi gerekmektedir.

Elde ettiğimiz veriler ışığında; Bio-Oss®:levan (3:1) ve (1:3) olarak uygulandığı defektlerde sadece Bio-Oss®'un uygulandığı kontrol grubuna göre radyolojik olarak olmasa da histopatolojik olarak anlamlı derecede daha fazla yeni kemik oluşumu meydana gelmiştir Bunun yanında (3:1)'de osteoblast yoğunluğu ve yeni damar oluşumu anlamlı derecede fazla çıkmıştır. En etkili kombinasyonun (3:1) olduğu anlaşılmaktadır. Aynı zamanda levan hidrojeli çevresinde meydana gelen enflamasyon miktarı, çok uzun yıllardır kullanılmakta olan Bio-Oss® ksenojenik kemik greftinden istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir, yani doku uyumu oldukça başarılıdır. Bu sonuçlar ışığında LH YKR'de, kemik greftleriyle kombine kullanılması durumunda oldukça başarılı sonuçlar elde edilebileceğini ortaya koymuştur böylece çoğunluğu ithal edilen kemik grefti miktarının azaltılmasıyla hastalara çıkabilecek tedavi maliyetinin düşürülebilecek olması öngörülmüştür.

8. KAYNAKÇA

Aggarwal, P, and A Zavras. 2012. 'Parathyroid hormone and its effects on dental tissues', *Oral Diseases*, 18: 48-54. Akay M. Genel Histoloji. 5. baskı. Ankara: Palme Yayınevi, 2001.

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: A pilot study. Int J Oral Maxillofac Implant 2004;19(1): 59–65.

A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, Cell. 126 (2006) 677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
American Rabbit Breeders Association. ARBA Recognized Breeds. 2011. Available at http://www.arba.net.

Altiparmak, Nur, Sidika Sinem Akdeniz, Eda Yilmaz Akcay, Burak Bayram, and Kenan Araz. 2020. 'Effect of induced membrane on guided bone regeneration in an experimental calvarial model', Journal of Craniofacial Surgery, 31: 879-83.

An, Yin-Zhe, Franz-Josef Strauss, Jin-Young Park, Yu Qin Shen, Daniel Stefan Thoma, and Jung-Seok Lee. 2022. 'Membrane fixation enhances guided bone regeneration in standardized calvarial defects: A pre-clinical study', Journal of Clinical Periodontology, 49: 177-87

Arrigoni E, de Girolamo L, Di Giancamillo A et al. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization. J. Orthop. Sci. 18(2), 331–339 (2013).

Aroni, M. A. T., de Oliveira, G. J. P. L., Spolidório, L. C., Andersen, O. Z., Foss, M., Marcantonio, R. A. C., Stavropoulos, A. 2019. "Loading deproteinized bovine bone with strontium enhances bone regeneration in rat calvarial critical size defects". Clinical Oral Investigations, 23(4), 1605–1614

A.T. Neffe, B.F. Pierce, G. Tronci, N. Ma, E. Pittermann, T. Gebauer, O. Frank, M. Schossig, X. Xu, B.M. Willie, M. Forner, A. Ellinghaus, J. Lienau, G.N. Duda, A. Lendlein, One step creation of multifunctional 3D architectured hydrogels inducing bone regeneration., Adv. Mater. 27 (2015) 1738–44. doi:10.1002/adma.201404787

Axente, E., Sima, F., Sima, L. E., Erginer, M., Eroglu, M. S., Serban, N., … Mihailescu, I. N. 2014. "Combinatorial MAPLE gradient thin film assemblies signalling to human osteoblasts". Biofabrication, *6*(3).

Avsar, G., Agirbasli, D., Agirbasli, M. A., Gunduz, O., Oner, E. T. 2018. "SC". Carbohydrate Polymers.

.Ayşegül Güleç, Banu Çakırer Bakkalbaşı, Alev Cumbul, Ünal Uslu, Burçin Alev, Ayşen Yarat. Effects of local platelet rich plasma injection on the rate of orthodontic tooth movement in a rat model: A histomorphometric study. American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics. January 2017, 151 (1), 92-103

Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., Mejdoub, H. 2012. "Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan". International Journal of Biological Macromolecules, *50*(2), 451–458.

Berg, A., Oner, E. T., Combie, J., Schneider, B., Ellinger, R., Weisser, J., … Schnabelrauch, M. 2018. "Formation of new, cytocompatible hydrogels based on photochemically crosslinkable levan methacrylates". International Journal of Biological Macromolecules, *107*, 2312–2319.

Bigham-Sadegh, A., Oryan, A. 2015. "Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering". Connective Tissue Research, *56*(3), 175–194.

Bingol F, Yoruk O, Bingol BO, Erdemci B, Ozkan O, Mazlumoglu MR. Estimation of the efficacy of chemo- radiotherapy on tumor regression in the patients with laryngeal cancer via computerized tomography using the Cavalieri method. Acta Otolaryngol 2015;6489:1-4.

Blaisdell, Frank E. 1925. 'The osteogenetic function of the periosteum', *Archives of Surgery*, 11: 933-45

Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A. 2012. "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds". Trends in Biotechnology, *30*(10), 546–554.

Boyne, P. J., Lilly, L. C., Marx, R. E., Moy, P. K., Nevins, M., Spagnoli, D. B., Triplett, R. G. 2005. "De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation". Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, *63*(12), 1693–1707.

Bozkaya S. Deproteinize ve demineralize kemik greftlerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Gazi University, 2005

Breeland G. Menezes RG. Embryology, Bone Ossification. Yayın Evi: StatPearls. Treasure Island (FL), 2019.

Brond AR. Fracture Healing. 2. baskı. New York, USA: Churchill Livingstone; 93–114 s, 1990.

Caló, E., Ballamy, L., and Khutoryanskiy, V.V. 2018. ‘’Hydrogels in Wound Management. Hydrogels: Design, Synthesis and Application in Drug Delivery and Regenerative Medicine’’ (128), CRC Press

Castañeda, S., Largo, R., Calvo, E., Rodríguez-Salvanés, F., Marcos, M. E., Díaz-Curiel, M., Herrero-Beaumont, G. 2006. "Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits". Skeletal Radiology, *35*(1), 34–41.

Chackartchi, T., Iezzi, G., Goldstein, M., Klinger, A., Soskolne, A., Piattelli, A., Shapira, L. 2011. "Sinus floor augmentation using large (1-2mm) or small (0.25-1mm) bovine bone mineral particles: A prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study". Clinical Oral Implants Research, *22*(5), 473–480.

Chen, Chih-Long, Han-Wen Tien, Chia-Hui Chuang, and Ying-Chieh Chen. 2019. 'A comparison of thebone regeneration and soft-tissue-formation capabilities of various injectable-grafting materials in a rabbit calvarial defect model', Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 107: 529-44.

Chen, S. H., Lei, M., Xie, X. H., Zheng, L. Z., Yao, D., Wang, X. L., … Qin, L. 2013. "PLGA/TCP composite scaffold incorporating bioactive phytomolecule icaritin for enhancement of bone defect repair in rabbits". Acta Biomaterialia, *9*(5), 6711–6722.

Chin, M., Ng, T., Tom, W. K., Carstens, M. 2005. "Repair of alveolar clefts with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) in patients with clefts". Journal of Craniofacial Surgery, *16*(5), 778–789.

Choudhury, P., Kumar, S., Singh, A., Kumar, A., Kaur, N., Sanyasi, S., Chawla, S., Goswami, C., Goswami, L. 2018. ‘’Hydroxyethyl methacrylate grafted carboxy methyl tamarind (CMT-g-HEMA) polysaccharide based matrix as a suitable scaffold for skin tissue engineering’’. Carbohydrate Polymers 189, 87-98.

Cinan, E., Cesur, S., Erginer Haskoylu, M., Gunduz, O., & Toksoy Oner, E. (2021). Resveratrol-Loaded Levan Nanoparticles Produced by Electrohydrodynamic Atomization Technique. Nanomaterials, 11(10), 2582.

Clark, R. A. F. 2001. "Fibrin and wound healing". Annals of the New York Academy of Sciences, *936*, 355–367.

Costa, R. R., Neto, A. I., Calgeris, I., Correia, C. R., Pinho, A. C. M., Fonseca, J., … Mano, J. F. 2013. "Adhesive nanostructured multilayer films using a bacterial exopolysaccharide for biomedical applications". Journal of Materials Chemistry B, *1*(18), 2367–2374.

Cowan PT KP. Anatomy. Içinde: anatomy. Treasure Island (FL): StatPearls, 2018.

Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. Am J Physiol 1990;258(Pt 1):L148-56.

Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H., Mejdoub, H. 2011. "Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats". International Journal of Biological Macromolecules, *49*(4), 742–746.

Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., Nyman, S. 1988. "Healing of bone defects by guided tissue regeneration". Plastic and Reconstructive Surgery.

Delgado-Ruiz, R. A., Calvo-Guirado, J. L., Romanos, G. E. 2015. "Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: Systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines". Clinical Oral Implants Research, *26*(8), 915–930.

Deluiz D, Oliveira LS, Pires FR, Tinoco EM. Time-dependent changes in fresh-frozen bone block grafts: tomographic, histologic, and histomorphometric findings. Clin Implant Dent Relat Res. 2015;17(2):296-306.

Demirci, T., Hasköylü, M. E., Eroğlu, M. S., Hemberger, J., Toksoy Öner, E. 2020. "Levan-based hydrogels for controlled release of Amphotericin B for dermal local antifungal therapy of Candidiasis". European Journal of Pharmaceutical Sciences, *145*(January).

Dewey, K. G. 2001. 'Nutrition, growth, and complementary feeding of the breastfed infant', *Pediatr Clin North Am*, 48: 87-104.

Doğan, H., B. Ozcelik, G. Gedikoğlu, and S. Senel. 2001. 'The effect o f calcitonin on osseous healing in guinea pig mandible', *J Endod*, 27: 160-3.

Ebraheim, N. A., H. Elgafy, and R. Xu. 2001. 'Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications', *J Am Acad Orthop Surg*, 9: 210-8.

Einhorn, Thomas A, and Louis C Gerstenfeld. 2015. 'Fracture healing: mechanisms and interventions', *Nature Reviews Rheumatology*, 11: 45-54.

Elgali, I., Omar, O., Dahlin, C., Thomsen, P. 2017. "Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited". European Journal of Oral Sciences, *125*(5), 315–337

El-Rashidy, Aiah A., Judith A. Roether, Leila Harhaus, Ulrich Kneser, and Aldo R. Boccaccini. 2017. 'Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models', *Acta biomaterialia*, 62: 1-28.

Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of hu- man trabecular bone: Three dimensional reconstruction of re- modeling sequence in normals and metabolic bone disease. Endocr Rev. 7;379–408, 1986.

Erginer, M., Akcay, A., Coskunkan, B., Morova, T., Rende, D., Toksoy, E. 2016. "Sulfated levan from Halomonas smyrnensis as a bioactive , heparin-mimetic glycan for cardiac tissue engineering applications". Carbohydrate Polymers, *149*, 289–296.

Esawy, M. A., Ahmed, E. F., Helmy, W. A., Mansour, N. M., El-Senousy, W. M., El-Safty, M. M. 2011. "Production of levansucrase from novel honey Bacillus subtilis isolates capable of producing antiviral levans". Carbohydrate Polymers, *86*(2), 823–830.

Fernandez de Grado, G., L. Keller, Y. Idoux-Gillet, Q. Wagner, A. M. Musset, N. Benkirane-Jessel, F. Bornert, and D. Offner. 2018. 'Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management', *J Tissue Eng*, 9: 2041731418776819.

Filler TJ, Punker ET, Pera F, Schulte E, Fanghanel J, Lembke C N˙ gerl HGßversorgung von K. Anatomie des Menschen. 17. baskı. Editör: Fanghanel J, Pera F,Anderhuber F, Nitsch R,. Berlin/New York: Walter de Gruyter; 26 s, 2003

Frost, Harold M. 2003. 'Bone's mechanostat: a 2003 update', *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 275: 1081-101.

Gartner LP. Color Textbook of Histology. Içinde: 2nd edition. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

Gartner Leslie P. Color Textbook of Histology. 114–130 s, 1997.

Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. 2005. "Bone substitutes: an update.". Injury, *36 Suppl 3*, 20–27.

Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. Am J Physiol. 1988;255:416–421

Glowacki, Julie. 1998. 'Angiogenesis in fracture repair', *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 355: S82-S89.

Gomes, P. S., Fernandes, M. H. 2011. "Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies". Laboratory Animals, 45(1), 14–24.

Gosain, A. K., Santoro, T. D., Song, L. S., Capel, C. C., Sudhakar, P. V., Matloub, H. S. 2003. "Osteogenesis in calvarial defects: Contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals". Plastic and Reconstructive Surgery.

Grossi-Oliveira, G., Faverani, L. P., Mendes, B. C., Braga Polo, T. O., Batista Mendes, G. C., Lima, V. N. De, … Magro-Filho, O. 2020. "Comparative Evaluation of Bone Repair with Four Different Bone Substitutes in Critical Size Defects". International Journal of Biomaterials, *2020*.

Guo, W., Douma, L., Hu, M. H., Eglin, D., Alini, M., Šećerović, A., ... & Peroglio, M. (2022). Hyaluronic acid-based interpenetrating network hydrogel as a cell carrier for nucleus pulposus repair. Carbohydrate Polymers, 277, 118828.

Gurel Pekozer G, Abay Akar N, Cumbul A, Beyzadeoglu T, Torun Kose G Investigation of Vasculogenesis Inducing Biphasic Scaffolds for Bone Tissue Engineering.. ACS Biomater Sci Eng. 2021 Apr 12;7(4):1526-1538. doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01071. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33740374

Gurtner, G.C., Bhatt, K., and Rajadas, J. 2017. Pullulan regenerative matrix, US Patents, US9636362B2.

Gül Merve Yalcin-Ülker, Alev Cumbul, Gonca Duygu-Capar, Ünal Uslu, Kemal Şençift. Preventive Effect of Phosphodiesterase Inhibitor Pentoxifylline against Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: An Animal Study. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 75:2354-2368, 2017.

Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S.M., and Tonelli, A.E. 2018. ‘’Chitosan Based Hydrogels and Their Applications for Drug Delivery in Wound Dressings: A Review’’. Carbohydrate polymers, 199, 445-460

Hämmerle, C. H. F., Jung, R. E. 2003. "Bone augmentation by means of barrier membranes". Periodontology 2000, *33*, 36–53.

Hämmerle, Christoph HF, Jürg Schmid, Niklaus P Lang, and Atilla J Olah. 1995. 'Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration', Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 53: 167-74.

Handschel, J., Simonowska, M., Naujoks, C., Depprich, R. A., Ommerborn, M. A., Meyer, U., Kübler, N. R. 2009. "A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials". Head and Face Medicine, *5*(1), 1–10.

Hasirci, V., Vrana, E., Zorlutuna, P., Ndreu, A., 2006. Nanobiomaterials: a review of the existing science and technology, and new approaches. J. Biomater. Sc.

Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F., Perale, G. 2019. "Bone grafts: which is the ideal biomaterial?". Journal of Clinical Periodontology, *46*(S21), 92–102.

He, P., Zhao, J., Zhang, J., Li, B., Gou, Z., Gou, M., and Li, X. (2018). Bioprinting of skin constructs for wound healing. Burns & trauma 6, 5.

Hollinger, J. O. 1990. "The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials". Journal of Craniofacial Surgery.

Hong, I., Khalid, A. W., Pae, H. C., Song, Y. W., Cha, J. K., Lee, J. S., … Choi, S. H. 2020. "Diverse patterns of bone regeneration in rabbit calvarial defects depending on the type of collagen membrane". Journal of Periodontal and Implant Science, *50*(1), 1–13.

Iwaniec, U. T., Wronski, T. J., Turner, R. T. 2008. "Histological analysis of bone". Methods in Molecular Biology, *447*, 325–341.

Joshi A, Kostakis GC: An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. Br Dent J, 196:167–171, 2004.

Junqueira LC, Carneiro J, Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji Text Atlas. 11th edition. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006

Jung, R. E., Zwahlen, R., Weber, F. E., Molenberg, A., Van Lenthe, G. H., Hammerle, C. H. F. 2006. "Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration". Clinical Oral Implants Research, *17*(4), 426–433.

Jung, S., Oh, H. K., Kim, M. S., Lee, K. Y., Park, H., Kook, M. S. 2020. "Effect of gellan gum/tuna skin film in guided bone regeneration in artificial bone defect in rabbit calvaria". Materials, *13*(6), 1–9.

Kaplan, B., B. Gönül, S. Dinçer, F. N. Dinçer Kaya, and A. Babül. 2004. 'Relationships between tensile strength, ascorbic acid, hydroxyproline, and zinc levels of rabbit full-thickness incision wound healing', *Surg Today*, 34: 747-51.

Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, Alican I. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. Life Sci. 2011 Sep 12;89(11-12):402-7

Kazak Sarilmiser, H., Toksoy Oner, E. 2014. "Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from Halomonas smyrnensis AAD6T". Biochemical Engineering Journal, *92*, 28–34.

Keramaris, NC, GM Calori, VS Nikolaou, EH Schemitsch, and PV Giannoudis. 2008. 'Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF', *Injury*, 39: S45-S57.

Kılıçoğlu, Sibel Serin. 2002. 'Mikroskobi düzeyinde kırık iyileşmesi', *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 55.

Kim, Somin, Yawon Hwang, Muhammad Kashif, Dosun Jeong, and Gonhyung Kim. 2016. 'Evaluation of bone regeneration on polyhydroxyethyl-polymethyl methacrylate membrane in a rabbit calvarial defect model', in vivo, 30: 587-91.

Kirtel, O., Menéndez, C., Versluys, M., Van den Ende, W., Hernández, L., Toksoy Öner, E. 2018. "Levansucrase from Halomonas smyrnensis AAD6T: first halophilic GH-J clan enzyme recombinantly expressed, purified, and characterized". Applied Microbiology and Biotechnology, *102*(21), 9207–9220.

Klrtel, O., Öner, E. T. 2021. "Chapter 6: Levan Polysaccharide for Biomedical Applications". RSC Soft Matter, *2021-Janua*(13), 134–154

Kumar, P., Vinitha, B., Fathima, G. 2013. "Bone grafts in dentistry". Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, *5*(SUPPL.1), 125–128.

Langer, R., and D. A. Tirrell. 2004. 'Designing materials for biology and medicine', *Nature*, 428: 487-92.

Lee JW, Lim HC, Lee EU, Park JY, Lee JS, Lee DW, Jung UW, Choi SH. Paracrine effect of the bone morphogeneticprotein-2 at the experimental site on healing of the adjacent control site: A study in the rabbit calvarial defect model. J Periodont Implant Sci 2014;44(4):178–183

Lee, S. S., Huang, B. J., Kaltz, S. R., Sur, S., Newcomb, C. J., Stock, S. R., ... & Stupp, S. I. (2013). Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds. Biomaterials, 34(2), 452-459.

Leite, A.J., Silva, J.M., Ates, O., Eroğlu, M.S., Öner, E.T., Mano, J.F., 2014. Bioadhesive and bioactive methacrylated nanocomposite levan-based beads for bone tissue applications. Presentation at 2nd International Conference on Biological and Biomimetic Adhesives. Istanbul 2014. (Available from URL: Öner.icbba2014.org/ pdf/ICBBA2014_CONGRESS_BOOK.pdf).

Li, X., Liu, X., Ni, S., Liu, Y., Sun, H., Lin, Q. 2019. "Enhanced osteogenic healing process of rat tooth sockets using a novel simvastatin-loaded injectable microsphere-hydrogel system". Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, *47*(7), 1147–1154.

Linde, A., Thorén, C., Dahlin, C., Sandberg, E. 1993. "Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: An experimental study in rats". Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, *51*(8), 892–897.

Liu, B., Li, J., Lei, X., Miao, S., Zhang, S., Cheng, P., ... & Pei, G. (2020). Cell-loaded injectable gelatin/alginate/LAPONITE® nanocomposite hydrogel promotes bone healing in a critical-size rat calvarial defect model. RSC Advances, 10(43), 25652-25661.

Li, YF, XD Li, CY Bao, QM Chen, H Zhang, and J Hu. 2013. 'Promotion of peri-implant bone healing by systemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface', *Osteoporosis International*, 24: 1063-71.

Lo Muzio, L., S. Tetè, F. Mastrangelo, A. P. Cazzolla, M. G. Lacaita, M. Margaglione, and G. Campisi. 2007. 'A novel mutation of gene CBFA1/RUNX2 in cleidocranial dysplasia', *Ann Clin Lab Sci*, 37: 115-20.

Lohmann, P., Willuweit, A., Neffe, A. T., Geisler, S., Gebauer, T. P., Beer, S., ... & Langen, K. J. (2017). Bone regeneration induced by a 3D architectured hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. Biomaterials, 113, 158-169.

Lucateli, R. L., Marciano, M. A., Ferreira, S., Garcia, I. R., Camilleri, J., Mariano, R. C. 2018. "Doxycycline and autogenous bone in repair of critical-size defects". Implant Dentistry, *27*(4), 461–466.

Mahinroosta, M., Jomeh Farsangi, Z., Allahverdi, A., Shakoori, Z. 2018. ‘’Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications’’, Materials Today Chemistry 8, 42-55

McGovern, J. A., Griffin, M., Hutmacher, D. W. 2018. "Animal models for bone tissue engineering and modelling disease". DMM Disease Models and Mechanisms, *11*(4).

Melcher, AH. 1976. 'On the repair potential of periodontal tissues', *Journal of Periodontology*, 47: 256-60.

Miller MD. Review of Orthopaedics. 2. baskı. 1–22 s, 1996.

Miloro M, Ghali G, Larsen P et al. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. PMPH-USA, 2004.

Miranda, S. R., H. Nary Filho, L. E. Padovan, D. A. Ribeiro, D. Nicolielo, and M. A. Matsumoto. 2006. 'Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts', *Clin Oral Implants Res*, 17: 694-9.

Misch, C. E., Dietsh, F. 1993. "Bone-grafting materials in implant dentistry". Implant Dentistry.

Mishra, S., Rani, P., Sen, G., Dey, K.P. 2018. ‘’Preparation, Properties and Application of Hydrogels: A Review. In Hydrogels’’, Springer, 145-173.

Muschler, G. F., Raut, V. P., Patterson, T. E., Wenke, J. C., Hollinger, J. O. 2010. "for Translational Research in Bone Tissue Engineering". Tissue engineering. Part B, *16*(1), 123–145.

Muzio, Lorenzo Lo, Stefano Tetè, Filiberto Mastrangelo, Angela Pia Cazzolla, Maria Grazia Lacaita, Maurizio Margaglione, and Giuseppina Campisi. 2007. 'A novel mutation of gene CBFA1/RUNX2 in cleidocranial dysplasia', *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 37: 115-20.

Nourmohammadi, J., Ghaee, A., & Liavali, S. H. 2016. “Preparation and characterization of bioactive composite scaffolds from polycaprolactone nanofibers-chitosan-oxidized starch for bone regeneration”. Carbohydrate polymers, 138, 172-179.

Osman, A., Oner, E. T., Eroglu, M. S. 2017. "Novel levan and pNIPA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release". Carbohydrate Polymers, *165*, 61–70.

Owen, David G. 1971. 'The incidence and nature of space closure following the premature extraction of deciduous teeth: a literature survey', *American journal of orthodontics*, 59: 37-49.

Özyurt, A., Ç Elmas, C. M. Seymen, V. T. Peker, B. Altunkaynak, and M. N. Güngör. 2018. 'Effects of Low-Level Laser Therapy With a Herbal Extract on Alveolar Bone Healing', *J Oral Maxillofac Surg*, 76: 287.e1-87.e10

Öber A. Histoloji. 1.baskı, Editör: Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006.

Öner, E. T., Hernández, L., Combie, J. 2016. "Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects". Biotechnology Advances, *34*(5), 827–844.

Özer, Taha, Alper Aktas, Emre Baris, Hakan Hamdi Çelik, and Alper Vatansever. 2017. 'Effects of local alendronate administration on bone defect healing. Histomorphometric and radiological evaluation in a rabbit model 1', Acta cirurgica brasileira, 32: 781-95.

Özer, Taha, Özgür Başlarlı, Alper Aktaş, Emre Barış, Hakan Hamdi Çelik, and Mert Ocak. 2019. 'Locally administrated single-dose teriparatide affects critical-size rabbit calvarial defects: A histological, histomorphometric and micro-CT study', Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica, 53: 478-84.

Özer, Taha, Özgür Başlarlı, Alper Aktaş, Emre Barış, and Mert Ocak. 2022. 'Effect of Locally Administered Denosumab on Bone Graft Healing in Rabbit Critical-Size Calvarial Defects', Indian Journal of Orthopaedics, 56: 1424-30.

Pantelić, I., Lukić, M., Gojgić-Cvijović, G., Jakovljević, D., Nikolić, I., Lunter, D. J., Savić, S. 2020. "Bacillus licheniformis levan as a functional biopolymer in topical drug dosage forms: From basic colloidal considerations to actual pharmaceutical application". European Journal of Pharmaceutical Sciences, *142*(June 2019).

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. J Bone Miner Res. 2;595–610, 1987.

Pearce A, Richards R, Milz S, et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater. 2007;13:1–10

Peng, J., Xu, W., Ni, D., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., Mu, W. 2019. "Preparation of a novel water-soluble gel from Erwinia amylovora levan". International Journal of Biological Macromolecules, *122*, 469–478.

Queiroz TP, Hochuli-Vieira D, Gabrielli MAC, Cancian DCJ. Use of bovine bone graft and bone membrane in defects surgically created in the cranial vault of rabbits. Histologic comparative analysis. Int J Oral Maxillofac Implant 2006;21(1):29–35

Rakhmatia, Y. D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A., Koyano, K. 2013. "Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications". Journal of Prosthodontic Research, *57*(1), 3–14.

B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 3rd ed., Academic Press, 2012

Raucci, M. G., Giugliano, D., Alvarez-Perez, M. A., Ambrosio, L. 2015. "Effects on growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the strontium-added sol–gel hydroxyapatite gel materials". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, *26*(2).

Rauch, Frank, and Francis H Glorieux. 2004. 'Osteogenesis imperfecta', *The Lancet*, 363: 1377-85.

Reichert, J.C. et al. Establishment of a preclinical bovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. Tissue Eng. Part B Rev. 16, 93–104 (2010).

Renno, A. C. M., Van De Watering, F. C. J., Nejadnik, M. R., Crovace, M. C., Zanotto, E. D., Wolke, J. G. C., … Van Den Beucken, J. J. J. P. 2013. "Incorporation

of bioactive glass in calcium phosphate cement: An evaluation". Acta Biomaterialia, *9*(3), 5728–5739.

Saad KA, Abu-Shahba AG, El-Drieny EA, Khedr MS. Evaluation of the role ofautogenous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for the repair of mandibular bone defects in rabbits. J. Craniomaxillofac. Surg. 43(7), 1151–1160 (2015).

Saulacic, N., Fujioka-Kobayashi, M., Kimura, Y., Bracher, A. I., Zihlmann, C., Lang, N. P. 2021. "The effect of synthetic bone graft substitutes on bone formation in rabbit calvarial defects". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, *32*(1).

Saulacic, N., Fujioka-Kobayashi, M., Kobayashi, E., Schaller, B., Miron, R. J. 2017. "Guided bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein 9 loaded on either deproteinized bovine bone mineral or a collagen barrier membrane". Clinical Implant Dentistry and Related Research, *19*(4), 600–607.

Schaller, Benoit, Masako Fujioka-Kobayashi, Claudio Zihlmann, Viola Christina Schuler, Hiroki Katagiri, Niklaus P Lang, and Nikola Saulacic. 2020. 'Effects of additional collagen in biphasic calcium phosphates: A study in a rabbit calvaria', *Clinical oral investigations*, 24: 3093-103.

Schmitz, J. P. y.y. "<Schmitz and Hollinger 1986.Pdf>", 299–308.

Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience 2005;130:813-31

Seebach E, Freischmidt H, Holschbach J, Fellenberg J, Richter W. Mesenchymal stroma cells trigger early attraction of M1 macrophages and endothelial cells into fibrin hydrogels, stimulating long bone healing without long-term engraftment. Acta Biomater. 10(11), 4730–4741 (2014).

Selvi, S. S., Hasköylü, M. E., Genç, S., & Toksoy Öner, E. (2021). Synthesis and characterization of levan hydrogels and their use for resveratrol release. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 36(6), 464-480.

Serin K. Mikroskobi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 55(2):143–50, 2002

Sezer, A. D., Sarılmışer, H. K., Rayaman, E., Çevikbaş, A., Öner, E. T., Akbuğa, J. 2015. "Development and characterization of vancomycin- loaded levan-based microparticular system for drug delivery Development and characterization of vancomycin-loaded levan-based", *7450*(December).

Sima, F., Mutlu, E. C., Eroglu, M. S., Sima, L. E., Serban, N., Ristoscu, C., … Mihailescu, I. N. 2011. "Levan nanostructured thin films by MAPLE assembling". Biomacromolecules, *12*(6), 2251–2256.

Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgiran M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 2019.

Simion, M., Trisi, P., Maglione, M., Piattelli, A. 1994. "A Preliminary Report on a Method for Studying the Permeability of Expanded Polytetrafluoroethylene Membrane to Bacteria In Vitro: A Scanning Electron Microscopic and Histological Study". Journal of Periodontology, 65(8), 755–761.

Simpson, A. H. R. W., Mills, L., Noble, B. 2006. "The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing". Journal of Bone and Joint Surgery - Series B, *88*(6), 701–705.

Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B. 2015. "Review on production, characterization and applications of microbial levan". Carbohydrate Polymers, *120*, 102–114.

Stark R, Tanczos H. Biological Matrices And Tissue Reconstruction. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag. 1998.

St John, T. A., A. R. Vaccaro, A. P. Sah, M. Schaefer, S. C. Berta, T. Albert, and A. Hilibrand. 2003. 'Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting', *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 32: 18-23.

Stumbras, A., Kuliesius, P., Darinskas, A., Kubilius, R., Zigmantaite, V., Juodzbalys, G. 2020. "Bone regeneration in rabbit calvarial defects using PRGF and adipose-derived stem cells: Histomorphometrical analysis". Regenerative Medicine, *15*(4), 1535–1549.

Stübinger, S., Dard, M. 2013. "The Rabbit as Experimental Model for Research in Implant Dentistry and Related Tissue Regeneration". Journal of Investigative Surgery, *26*(5), 266–282.

Takada, T., Katagiri, T., Ifuku, M., Morimura, N., Kobayashi, M., Hasegawa, K., ... & Kamijo, R. 2003. "Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins". Journal of Biological Chemistry, 278(44), 43229-43235.

Thoma, D. S., Jung, U. W., Park, J. Y., Bienz, S. P., Hüsler, J., Jung, R. E. 2017. "Bone augmentation at peri-implant dehiscence defects comparing a synthetic polyethylene glycol hydrogel matrix vs. standard guided bone regeneration techniques". Clinical Oral Implants Research, *28*(7), e76–e83.

Titsinides, S., Agrogiannis, G., Karatzas, T. 2019. "Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review". Japanese Dental Science Review, *55*(1), 26–32.

Tolstunov, L., J. F. E. Hamrick, V. Broumand, D. Shilo, and A. Rachmiel. 2019. 'Bone Augmentation Techniques for Horizontal and Vertical Alveolar Ridge Deficiency in Oral Implantology', *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 31: 163-91.

N. Tovar, R. Jimbo, R. Gangolli, L. Perez, L. Manne, D. Yoo, F. Lorenzoni, L. Witek, P.G. Coelho, Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: An experimental calvaria defect study. Int J Oral Maxillofac Surg 2014;43(2):251–260

Tunçay Ekin Ö. Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Ankara; 2013.

Tuskan C. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateyaller. İstanbul Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Yayınları. 2002.

Urban, I. A., Monje, A. 2019. "Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction". Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America, *31*(2), 331–338.

Urban, I., Monje, A., Lozada, J., Wang, H.-L. 2017. "Principles for Vertical Ridge Augmentation in the Atrophic Posterior Mandible: A Technical Review". The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, *37*(5), 639–645.

Xu, W., Dong, S., Han, Y., Li, S., and Liu, Y. 2018. ‘’Hydrogels as Antibacterial Biomaterials’’, Current pharmaceutical design 24, 843-854

Valentin-Opran, A., Wozney, J., Csimma, C., Lilly, L., Riedel, G. E. 2002. "Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2". Clinical Orthopaedics and Related Research, (395), 110–120.

Vignoletti, F., Abrahamsson, I. 2012. "Quality of reporting of experimental research in implant dentistry. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation". Journal of Clinical Periodontology, *39*(SUPPL.12), 6–27.

Wang, Z., Han, L., Sun, T., Wang, W., Li, X., Wu, B. 2021. "Osteogenic and angiogenic lineage differentiated adipose-derived stem cells for bone regeneration of calvarial defects in rabbits". Journal of Biomedical Materials Research - Part A, *109*(4), 538–550.

Yilmaz, C., E. Erdemli, H. Selek, H. Kinik, M. Arikan, and B. Erdemli. 2001. 'The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures', *Arch Orthop Trauma Surg*, 121: 426-8.

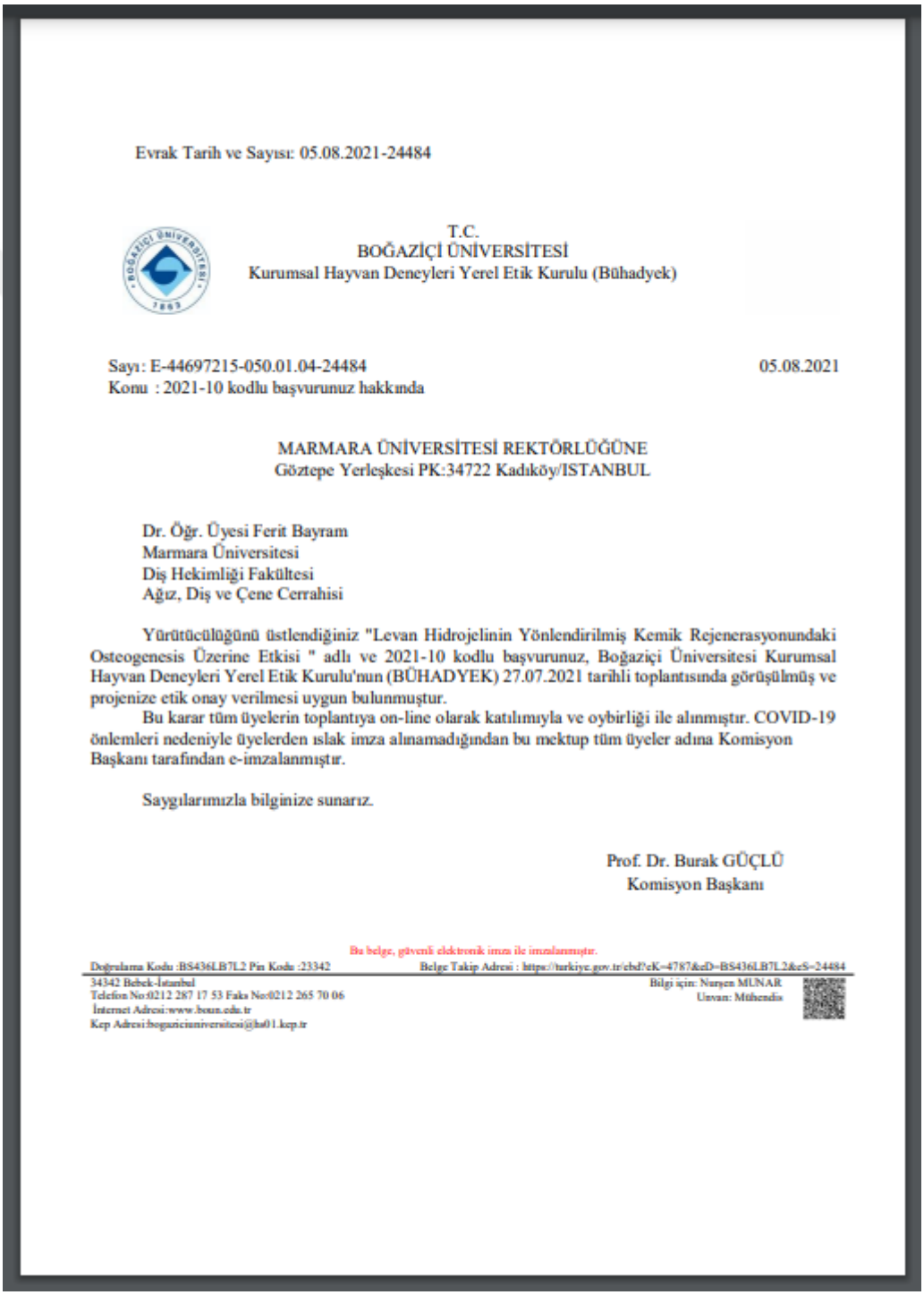
Yamada, M., Egusa, H. 2018. "Current bone substitutes for implant dentistry". Journal of Prosthodontic Research, *62*(2), 152–161.

Yang, R., Tan, L., Cen, L., & Zhang, Z. (2016). An injectable scaffold based on crosslinked hyaluronic acid gel for tissue regeneration. RSC Advances, 6(20), 16838-16850.

Yazdi FK, Mostaghni E, Moghadam SA, Faghihi S, Monabati A, Amid R. A comparison of the healing capabilities of various grafting materials in critical-size defects in guinea pig calvaria. Int J Oral Maxillofac Implant 2013;28(5):1370–1376.

9. EKLER

EK-1: Etik Kurul Kararı



Evrak Tarih ve Sayısı: 05.08.2021-24484

T.C.
BOĞAZİÇİ ÜNİVERSİTESİ
Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Bühadyek)

Sayı: E-44697215-050.01.04-24484 05.08.2021
Konu : 2021-10 kodlu başvurunuz hakkında

MARMARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
Göztepe Yerleşkesi PK:34722 Kadıköy/ISTANBUL

Dr. Öğr. Üyesi Ferit Bayram
Marmara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi

Yürütücülüğünü üstlendiğiniz "Levan Hidrojelinin Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonundaki Osteogenesis Üzerine Etkisi " adlı ve 2021-10 kodlu başvurunuz, Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (BÜHADYEK) 27.07.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş ve projenize etik onay verilmesi uygun bulunmuştur.

Bu karar tüm üyelerin toplantıya on-line olarak katılımıyla ve oybirliği ile alınmıştır. COVID-19 önlemleri nedeniyle üyelerden ıslak imza alınamadığından bu mektup tüm üyeler adına Komisyon Başkanı tarafından e-imzalanmıştır.

Saygılarımızla bilginize sunarız.

Prof. Dr. Burak GÜÇLÜ
Komisyon Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Doğrulama Kodu :BS436LB7L2 Pin Kodu :23342 Belge Takip Adresi : https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4787&eD=BS436LB7L2&eS=24484
34342 Bebek-İstanbul
Telefon No:0212 287 17 53 Faks No:0212 265 70 06
İnternet Adresi:www.boun.edu.tr
Kep Adresi:bogazicniversitesi@hs01.kep.tr
Bilgi için: Nurşen MUNAR
Unvan: Mühendis

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı	Celalettin Yiğit	**Soyadı**	Akkülah

EĞİTİM BİLGİLERİ:

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora / Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2017
Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2017
Lise	Nişantaşı Anadolu Lisesi	2012

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İNGİLİZCE	İYİ	ORTA	İYİ
FRANSIZCA	ORTA	ORTA	ORTA

Yabancı Dil Sınav Notu*								
YDS	TIP DİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	62							