

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI DOKU İSKELELERİ ÜZERİNDE
EX VIVO OLUŞTURULAN BAĞ DOKUSU EŞ DEĞERLERİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Melike KOLAY**

**Danışman
Doç.Dr. Banu Arzu ALKAN**

Doktora Tezi

**Aralık 2013
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI DOKU İSKELELERİ ÜZERİNDE
EX VIVO OLUŞTURULAN BAĞ DOKUSU EŞ DEĞERLERİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Melike KOLAY**

**Danışman
Doç.Dr. Banu Arzu ALKAN**

Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSO-12-3831no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2013
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Melike KOLAY

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Farklı doku iskeleleri üzerinde ex vivo oluşturulan bağ dokusu eşdeğerlerinin histolojik olarak incelenmesi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Melike KOLAY

Danışman

Doç.Dr. B. Arzu ALKAN

Periodontoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Cem A. GÜRGAN

İmza

Doç. Dr. B. Arzu Alkan danışmanlığında **Melike KOLAY** tarafından hazırlanan “**Farklı doku iskeleleri üzerinde ex vivo oluşturulan bağ dokusu eşdeğerlerinin histolojik olarak incelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Periodontoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

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

(Tez savunma sınav tarihi yazılacaktır.)

JÜRİ:

Danışman : Doç.Dr.B. Arzu ALKAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. İnci DEVRİM

Üye : Prof. Dr. Cem A. GÜRGAN

Üye : Yrd. Doç.Dr.Servet KESİM

Üye : Doç. Dr. Erdem KILIÇ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Ziyadesiyle uzun süren doktora eğitimim ilk gününden itibaren çalışma motivasyonumu artırıp, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, sabır, tecrübe, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamdaki ‘şems’ im olan, yolumu aydınlatan, zaman zaman canımı yakan, sınırsız eleştirilerine gönül koyduğum, naif gönül alışlarına hayran kaldığım, hiç gözüne giremediğim, bir türlü yetemediğim, ne başarısına yaklaşılabildiğim, ne de öğretilerinden uzaklaşılabildiğim, emek vereni, yetiştireni değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. B. Arzu ALKAN’a, doktora eğitimim boyunca yardım ve emeğini esirgemeyen, engin hoşgörüsüyle yüreğimi ısıtan ve kendine orda daimi bir yer edinen değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Servet KESİM’e, tezimin laboratuvar aşamasında değerli görüş ve yardımlarını eksik etmeyen sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR’a, bilgisi ve deneyimini güçlü dostluk bağlarıyla harmanlayıp tezimin laboratuvar aşamasını eğlenceli kılan güzel arkadaşım Dr. Nazife TAŞÇIOĞLU’na ve Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik A.D.’da görev yapan diğer asistan arkadaşlarıma, tezimin histoloji aşamasında haddinden fazla merakım sebebiyle sorduğum tüm soruları sabırla yanıtlayarak bilgi ve tecrübesini cömertce paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR’a, yoğun görev temposu içinde iş disiplininden ödün vermeden çalışan, bilimsel ve duygusal desteği ile tezimin histolojik inceleme safhasını bana sevdiren arkadaşım Esra BALCIOĞLU’na ve Erciyes Üniversitesi Histoloji A.D.’da görev yapan diğer çalışanlara, tezimin yazım aşamasında birkez dahi beni kırmadan emeklerini esirgemeyen, kendilerine münhasır asistan odası eğlenceleriyle çalışma ortamımı neşeli kılan afacanlarım, kardeşlerim Dr. Akın Erdem YAĞAN, Dr. Ömer ÇAKMAK ve (eş zamanlı olarak onursal genel koordinatör ve ultra-akademik nadide kişilik) Dr. Mehmet KARA’ya, duygusal desteğiyle tez süresince yaşadığım buhranların aşılmasında önemli bir yere sahip, çalışma disipliniyle örnek, şefkati ile abla olan Dr. Duygu KILIÇ’a, pratik zekaları, limitsiz güldürebilme kapasiteleri,baş koyabildiğim omuzları ve sıcacık yürekleri ile acı sabah kahvelerime tad katan şekerlerim, muhteşem-ultraşen iklim Merve ÇALAPKORUR ve Banu DURUKAN’a, doktora yaşantıma renk katan ve devir hastalarımı beni üzmeden kabul eden değerli asistan arkadaşlarım Mahmut YILDIRIM’a, Merve TÜRKER’e, Zekeriya ve Funda TAŞDEMİR’e, Mehmet ERCAN’a ve tüm mesai arkadaşlarıma, çalışmalarım süresince başta çocuk bakımı olmak üzere birçok fedakarlıkta bulunan, tezimi bitirebilmem için saçını süpürge eden birtanecik eşim Ali Şükrü KOLAY’a, bu süreçte kendini ihmal etmeme rağmen beni sevmekten vazgeçmeyen biricik oğlum, neşem Mustafa KOLAY’a , yaşamımın her döneminde duydukları güven ve hissettirdikleri destek için aileme en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Melike KOLAY

FARKLI DOKU İSKELELERİ ÜZERİNDE OLUŞTURULAN EX VIVO BAĞ DOKUSU EŞ DEĞERLERİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Melike KOLAY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Periodontoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Aralık 2013

Danışman: Doç. Dr. B. Arzu ALKAN

ÖZET

Periodontoloji alanında yapılan doku mühendisliği çalışmaları son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. Bu çalışmanın birinci amacı plateletten zengin fibrin (PZF) membran ve kollajen membran üzerinde fibroblast kültürü gerçekleştirerek ex vivo oluşturulan dokunun histolojik olarak incelenmesidir. İkinci amacı ise PZF membranın kollajen membran ile desteklenmesi durumunda PZF'nin hücre proliferasyonuna etkisinin araştırılmasıdır.

Dişeti biyopsileri 20 yaş diş çekim endikasyonu konulmuş 18 sağlıklı bireyden alındı. Örnekler enzimatik parçalama işlemine tabi tutulup, dişeti fibroblastlarının doku kültürü medyumunda içinde kültürü yapıldı. Fibroblastlar %80 konfluenseye ulaştığında, kaldırılıp, membran parçaları (Kollajen, PZF ve kollajen/PZF) üzerine ekildi. Ekim sonrası kültürün 7. gününde membranlar kaldırılıp, histolojik inceleme ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemesi için fikse edildi. İnceleme yapılırken membranlar üzerinde oluşan bağ dokusundaki fibroblast sayıları, fibroblast dizilerinin uzunlukları ve bağ dokusunun kapladığı alanlar ölçüldü.

Tüm membran gruplarında fibroblast ekimini takiben 7. gününde benzer histolojik özelliklere sahip bağ dokusu oluşumu gözlenmiştir. Membran gruplarında fibroblast sayısı ve alan ölçümleri açısından anlamlı fark bulunmaz iken, PZF/kollajen membran grubunda fibroblast dizisi uzunlukları anlamlı derecede daha az bulunmuştur. SEM bulguları, histolojik bulguları desteklemektedir. PZF membran kollajen membran ile desteklendiğinde ex vivo fibroblast proliferasyonuna ek fayda sağlamamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dişeti çekilmeleri; plateletten zengin fibrin; kollajen membran; dişeti fibroblastları; doku mühendisliği.

HISTOLOGICAL EVALUATION OF EX VIVO PRODUCED CONNECTIVE TISSUE EQUIVALENT ON DIFFERENT SCAFFOLDS

Melike KOLAY

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Periodontology

Doctorate Thesis, December 2013

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. B. Arzu ALKAN

ABSTRACT

Tissue engineering studies have become popular in recent years. The aim of this study was to 1) make a histologic analysis of the tissue which was obtained ex vivo on PRF and collagen membranes by fibroblast eksplants and to 2) evaluate the effects PRF membrane on fibroblast proliferation in case the PRF membrane was supported by a collagen membrane. Human gingival biopsy was harvested from 18 patients during the extraction of wisdom teeth. Specimens were enzymatically dissociated and gingival fibroblasts were cultered in tissue culture medium. When fibroblasts reached a confluency of 80%, they were detached and seeded on membrane pieces (collagen, PRF and collagen+PRF). Membranes were removed from the tissue culture medium at 7 days post-seeding of the fibroblasts and fixed for histologic and SEM examinations. During histological examination, number of fibroblasts, length of fibroblast arrays and area of the connective tissue that formed on membranes were measured. At 7 days post-seeding of fibroblasts, connective tissue formation with similar histological features was observed on all membrane groups. Although no significant differences were determined in terms of fibroblast number and connective tissue area formed on membranes among all the groups, length of fibroblast arrays in PRF/collagen membrane group had significantly lower values. Findings of SEM analysis supported histological findings. PRF showed no beneficial effects on ex vivo fibroblast proliferation on collagen membrane.

Keywords: Gingival recessions; platelet rich fibrin; kollagen membrane; gingival fibroblasts; tissue engineering.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
RESİMLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MUKOGİNGİVAL PROBLEMLER	4
2.2. DIŞETİ ÇEKİLMELERİ	4
2.2.1. Dişeti Çekilmelerinin Tanımlaması	4
2.2.2. Dişeti Çekilmelerinin Sınıflandırılması	5
2.2.3. Dişeti Çekilmelerinin Etiyolojisi	8
2.2.4. Dişeti Çekilmelerinin Meydana Getirdiği Sorunlar ve Tedavileri	11
2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	15
2.3.1. Doku Mühendisliği Stratejileri	15
2.3.1.1. İzole Edilmiş Hücrelerle Tedavi	16
2.3.1.2. Doku Gelişimini Hızlandıran Maddelerle Tedavi	16
2.3.1.3. Bir Destek Materyal Üzerine Ya Da İçerisine Yerleştirilmiş Hücrelerle Tedavi	16
2.3.2. Doku Mühendisliği Çalışmalarında Karşılaşılan Güçlükler	17
2.3.2.1. Biyolojik Zorluklar	17
2.3.2.2. Mühendislikteki Zorluklar	18
2.3.2.3. Klinik Zorluklar	19
2.3.3. Diş Hekimliğinde Doku Mühendisliği Stratejileri	19

2.3.3.1. Gen Tedavisi	19
2.3.3.2. Doku İndüksiyonu	20
2.3.3.3. Doku Kondüksiyonu	21
2.3.3.4. Hücre Nakli	21
2.3.4. Maksillo Fasiyal Bölgede Doku Mühendisliği Uygulama Alanları.....	22
2.4. PLATELETTEN ZENGİN FİBRİN	25
2.4.1. Geçmişten Günümüze Platelet Konsantreleri.....	25
2.4.2. Plateletten Zengin Fibrin(PZF).....	26
2.4.2.1. PZF Çeşitleri	27
2.4.2.1.1. Lökositten Fakir veya Saf Plateletten Zengin Fibrin(S-PZF) Konsantresi	27
2.4.2.2.1. Lökosit ve Plateletten Zengin Fibrin(L-PZF) konsantresi(Choukroun ‘un PZF’ si)	27
2.4.3. Farklı Polimerizasyonlar, Farklı Biyolojiler.....	28
2.4.4. PZF İçindeki Platelet Dağılımı, Büyüme Faktörleri Ve Sitokinler	31
2.4.4.1. Transforme Edici Büyüme Faktörü β -1(TGF β -1)	31
2.4.4.2. Platelet Kaynaklı(türevi) Büyüme Faktörleri(PDBF)	32
2.4.4.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü(IGF)	32
2.4.4.4. İnterlökin-1 β (IL-1 β).....	32
2.4.4.5. İnterlökin-6(IL-6)	32
2.4.4.6. Tümör Nekroze Edici Faktör α (TNF- α).....	33
2.4.4.7. İnterlökin 4(IL-4).....	33
2.4.4.8. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü(VEGF)	33
2.4.5. İyileşmeye Etkileri.....	33
2.4.6. PZF’nin Klinik Uygulamaları.....	35
2.4.7. İn vitro çalışmalar	37
3. GEREÇ- YÖNTEM	40
3.1. DİŞETİ FİBROBLAST KÜLTÜRÜ.....	40
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumların İçeriği.....	40
3.1.1.1. Taşıma Medyumu	40
3.1.1.2.Ön Hazırlık Medyumu(CCM)	41
3.1.1.3. Doku Kültür Medyumu	41
3.1.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması Ve Takibi.....	42
3.2. Histolojik İnceleme	52
3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM) İncelemesi.....	56
4. BULGULAR.....	i

4.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI	58
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	59
4.2.1. PZF Membran Grubuna Ait Bulgular	60
4.2.2. PRF/kollajen Membran Grubuna Ait Bulgular.....	64
4.2.3. Kollajen Membran Grubuna Ait Bulgular.....	68
4.3. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU(SEM) BULGULARI	71
4.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR	77
4.4.1. Fibroblast Sayısı Bulguları.....	77
4.4.2. Kesintisiz Fibroblast Dizisi Uzunluğu	78
4.4.3. Fibroblast Hücrelerinin Kapladığı Alan	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
6. KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ADMA	: Aselüler Dermal Matriks Allogrefti
PZF	: Plateletten Zengin Fibrin
AAP	: Amerikan Periodontoloji Akademisi
MSS	: Mine Sement Sınırı
MDP	: Mikrobiyal Dental Plak
LKF	: Laterale Konumlandırılmış Flep
KKF	: Kronale Konumlandırılmış Flep
SDG	: Serbest Dişeti Grefti
BDG	: Bağ Dokusu Grefti
YDR	: Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu
EMD	: Mine Matriks Proteinleri
ADA	: Adenozin Deaminaz Enzimi
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
PDL	: Periodontal Ligament
BG	: Biogide
BM	: Biomend
OS	: Ossix
TD	: Tutudent
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
PZP	: Plateletten Zengin Plazma
KKH	: Kırmızı Kan Hücresi
BKH	: Beyaz Kan Hücresi
S-PZF	: Lökositten Fakir Veya Saf Plateletten Zengin Fibrin Konsantresi
PZFM	: Plateletten Zengin Fibrin Matriks
PFP	: Plateletten Fakir Plazma
L-PZF	: Lökosit ve Plateletten Zengin Fibrin
TGF B-1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü B-1
PDBF	: Platelet Kaynaklı(Türevi) Büyüme Faktörleri
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1B	: İnterlökin-1B
IL-6	: İnterlökin-6
TNF-α	: Tümör Nekroze Edici Faktör α
IL-4	: İnterlökin 4
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
FBÜ	: Fibrin ve Fibrinojen Bozunma Ürünleri

DKKA	: Dondurulmuş Kurutulmuş Kemik Allogrefti
YKR	: Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu
KKE	: Krestal Kor Elevasyon
ALP	: Alkalen Fosfataz
f-EDK	: Fosforile Ekstrasellüler Sinyalle Düzenlenen Protein Kinaz
OPG	: Osteoprotegerin
H	: Histoloji
K	: Kollajen Membranın Kullanıldığı Eksplant Grubu
PZF/K	: Plateletten Zengin Fibrin ve Kollajen Membranın Birlikte Kullanıldığı Eksplant Grubu
OsO4	: Osmiumtetroksit
H-E	: Hematoksilen-Eozin
M-T	: Masson'un Üçlü Boyası
SE	: Sekonder Elektron Modu

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Ariaudo ve ark.'nın dişeti çekilmeleri sınıflaması	5
Tablo 2.2.	Kök örtümü için uygulanan yöntemler	13
Tablo 2.3.	Doku mühendisliğinde karşılaşılan güçlükler	17
Tablo 3.1.	Işık Mikroskobu İçin Doku Hazırlama Tekniği	52
Tablo 3.2.	Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği	53
Tablo 3.3.	Masson'un Üçlü Boyama Tekniği	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Sullivan ve Atkins'ın dişeti çekilmesi sınıflaması	6
Şekil 2.2.	Miller'in dişeti çekilmeleri sınıflandırması.....	7
Şekil 2.3.	Nordland ve Tarnow'un dişeti çekilmesi sınıflandırması	8
Şekil 2.4.	Bilateral bağlantılar	30
Şekil 2.4.	Equilateral bağlantılar.....	30
Şekil 2.5.	PZF'nin şematik görüntüsü.....	31
Şekil 4.1.	Eksplant kesitlerindeki fibroblast sayısı değerleri.....	78
Şekil 4.2.	Eksplant kesitlerindeki kesintisiz fibroblast uzunluğu değerler... ..	78
Şekil 4.3.	Eksplant kesitlerindeki fibroblastların kapladığı alan değerleri... ..	79

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1.	Ham's F10	41
Resim 3.2.	Penisilin-Streptomisin.....	41
Resim 3.3.	Tripsin-EDTA	41
Resim 3.4.	Kollajenaz	41
Resim 3.5.	RPMI 1640.....	42
Resim 3.6.	Bio-Amf-1 bazal medyum ve supplement... ..	42
Resim 3.7.	Dişeti biyopsi örneğinin alımı.....	42
Resim 3.8.	Çalışmada kullanılan steril hücre kültür tüpleri.....	43
Resim 3.9.	Laminar airflow steril kabin.....	43
Resim 3.10.	Petri içine alınan biyopsi materyali.....	43
Resim 3.11.	CO ² 'li inkübatör.....	44
Resim 3.12.	Makroskopik parçalama.....	44
Resim 3.13.	Jouan B4 i Santrifüj cihazı.....	44
Resim 3.14.	Kuru hava etüvü.....	45
Resim 3.15.	Hücre kültürü flaskaları.....	46
Resim 3.16.	Steril şırınga filtresi.....	46
Resim 3.17.	Hücre süspansiyonlarına medyum eklenmesi ve flasklara ekim.....	46
Resim 3.18.	İnverted mikroskop	47
Resim 3.19.	Yeni kültürü yapılmış(flaska tutunmamış) fibroblastların inverted mikroskop görüntüsü	47
Resim 3.20.	Ortalama 15 gün sonunda %80 konflenseye ulaşmış fibroblastların inverted mikroskop görüntüsü.....	48
Resim 3.21.	Farklı hücrelerin ürediği ve çalışma dışı bırakılan tek flaskın inverted mikroskop görüntüsü	48
Resim 3.22.	Kültürün sonlandırılması.....	49
Resim 3.23.	Toma Lamı.....	49
Resim 3.24.	10 ml'lik antikoagülansız tüplerle kan alımı.....	50
Resim 3.25.	PZF yapımında kullanılan santrifüj cihazı.....	50
Resim 3.26.	Tüpte jel halinde olan PZF'nin PZF kutusunda membran haline getirilmesi.....	50
Resim 3.27.	Üzerinde fibroblast kültürü gerçekleştirilen membran grupları.....	51
Resim 3.28.	Çalışmada kullanılan kollajen membran	51
Resim 3.29.	Hematoksilen-Eozin ile boyama yapılmış bir PZF membran kesitinde fibroblast hücre çekirdeklerinin sayımı	55

Resim 3.30.	Hematoksilen-Eozin ile boyama yapılmış bir PZF membran kesitinde kesintisiz fibroblast dizisinin uzunluğunun ölçülmesi.....	55
Resim 3.31.	Hematoksilen-Eozin ile boyama yapılmış bir PZF membran kesitinde, sayılan fibroblastların kapladığı alan.....	56
Resim 3.32.	Leica RM 2155 mikrotom... ..	57
Resim 3.33.	Olympus BX51 mikroskop.....	57
Resim 3.34.	Kritik nokta kurutucusu	57
Resim 3.35.	Sputter coater	57
Resim 3.36.	Taramalı elektron mikroskobu	57
Resim 4.1.	Dışeti biyopsi materyalleri ve elde edilen hücrelerin inkübasyon öncesi inverted mikroskop görüntüleri.....	58
Resim 4.2.	PZF üzerinde oluşan rezorpsiyon alanları.....	60
Resim 4.3.	PZF"ye paralel matriks yığılımı.....	61
Resim 4.4.	PZF membran yüzeyine yakın fibroblastlar, membran yüzeyinden uzaklaştıkça artan matriks yığılımı.....	62
Resim 4.5.	PZF membran grubu. M-T boyama	63
Resim 4.6.	PZF/kollajen membran grubu. PZF –kollajen membran arası ve bağ dokusundaki ayrılımlar	64
Resim 4.7.	Kollajen ve PZF membranlar arasında fibroblastlardan meydana gelen bağlantı.....	65
Resim 4.8.	PZF ve kollajen membran yüzeylerinde meydana gelen fibroblast... ..	66
Resim 4.9.	PZF/kollajen membran . PZF üzerindeki yoğun fibroblast proliferasyon alanı proliferasyonu	67
Resim 4.10.	Kollajen membran grubu. Birbirinden uzak yerleşim gösteren fibroblastlar arası yoğun matriks oluşumu	68
Resim 4.11.	Kollajen membran lifleri arasına ilerlemiş ve onunla bütünleşmiş bağ dokusu.....	69
Resim 4.12.	Kollajen membran grubu. M-T boyama.....	70
Resim 4.13.	Kollajen membran üzerinde sık dizilenmiş fibroblastlar ve ince kollajen lifler	71
Resim 4.14.	PZF membran grubu. Membran yüzeyinin tamamen bağ dokusu ile kaplanması	72
Resim 4.15.	PZF/kollajen membran grubu. Bağ dokusu ile kaplanmış membran yüzeyi	72

Resim 4.16.	Kollajen membran grubu. Bağ dokusu ile kaplanmış membran yüzeyi.....	73
Resim 4.17.	PZF membran grubu. Fibroblastların membran üzerinde yerleşimleri	74
Resim 4.18.	PZF membran grubu . Filopodlar.....	75
Resim 4.19.	PZF/kollajen membran grubu. PZF membran üzerinde fibroblastların yerleşimi	76
Resim 4.20.	PZF/kollajen membran grubu. PZF yüzeyinde fibrin aę ve fibroblastlar	77
Resim :4.21.	Kollajen membran grubu. Mebrana ait kollajen lif demetleri, fibroblastlardan sentezlenen kollajen iplikçikler ve fibroblastlar.....	78

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dişeti çekilmeleri yetişkin nüfusun önemli bir bölümünü etkileyen ve tedavisinde farklı yöntemlerin kullanıldığı bir durumdur (1). Dişeti çekilmesi dişeti kenarının mine-sement sınırının apikaline doğru kök yüzeyi boyunca hareket etmesi olarak tanımlanabilir (2, 3). Yapışık keratinize dokunun ince ve yetersiz olması, yetersiz vestibül derinlik, vestibüler alveoler kemiğin ince olması, frenilum çekmeleri, hastanın travmatik kötü alışkanlıkları, yanlış diş fırçalama, periodontal hastalıklar ve tedavileri, hekim hatalarına bağlı faktörler, okluzal travma, ilerleyen yaş gibi nedenlerle dişeti çekilmeleri meydana gelebilmektedir (4), (5). Dişeti çekilmeleri sonucunda dentin hassasiyeti (4, 6-8), mikrobiyal dental plak (MDP) birikimi ve enflamasyon oluşumu (6, 8), kök çürüğü oluşumu (6, 9, 10), estetik sorunlar (4, 8, 11), hastanın dişini kaybetme korkusu (4, 6) gibi problemler ortaya çıkmaktadır. Dişeti çekilmelerinin tedavisi etyolojik faktörlerin ve semptomların ortadan kaldırılması ve cerrahi kök örtüm işlemlerini içermektedir. Saplı flepler ile birlikte uygulanan bağ dokusu grefti kök örtümü tedavisinde altın standart olarak kabul görmektedir (12). Yüksek öngörülebilirliği olan bu yöntemin estetik açıdan serbest dişeti greftine göre daha iyi sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 14). Bu yöntem ile greft, hem üzerine yerleştirildiği periosteum hem de üzerinin örtüldüğü flepten beslendiğinden dolayı başarılı bir kök yüzeyi örtümü sağlanabilmektedir. Farklı saplı flep teknikleriyle beraber uygulanan bağ dokusu grefti yönteminin avantajlarını ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (13-22). İkinci bir yara bölgesi oluşturulması, tekniğin hassasiyet gerektirmesi, uygulama süresinin uzunluğu, yetersiz miktarda greft elde edilme ihtimali, komplike süturlar, operasyon sahasında biyotipin istenmeyen düzeyde kalınlaşması, donör saha ağrısı ve morbiditesi tekniğin dezavantajları arasındadır. Kök örtümünde uygulanan yöntemlerin sınırlamalarını ortadan kaldıran, başarı öngörüsü yüksek olan yeni yöntemler ve doku mühendisliği ürünleri periodontologların ilgisini çekmektedir.

“Doku mühendisliği” doku ve organların fonksiyonunu restore etmek, geliştirmek ve sağlığına yeniden kavuşturmak amacıyla biyoloji, tıp, diş hekimliği ve mühendislik dallarının birlikte çalıştığı multidisipliner bir bilim alanı olarak tanımlanmaktadır (23). Doku mühendisliğinde yeni bir dokunun oluşması için, izole edilen hücrelerin infüzyonu, doku uyarıcı maddelerin üretimi ve taşınması, hücrelerin matrikslerin üzerinde veya içerisinde konumlanmaları ve transferi gibi stratejiler uygulanmaktadır (24). Diş hekimliğinde bu stratejiler kullanılarak oral mukoza, bağ dokusu ve keratinize dişeti üretimi ve hastalara transplantasyonu ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Dişeti bağ dokusunun başlıca bileşenleri kollajen lifler, fibroblastlar, damarlar, sinirler ve hücreler arası matrikstir (25). Simain-Sato ve ark.’nın hayvanlarda ve Pini Prato ve ark.’nın insanlarda yaptıkları çalışmalarda, otojen konak dokusundan izole edilerek kültür yöntemi ile çoğaltılan fibroblastlarla bağ dokusu elde edilebileceği gösterilmiştir (26). Dominiak ve ark.’nın yaptıkları çalışmada (27) kollajen membranlar üzerinde kültürleri gerçekleştirilen dişeti fibroblastlarıyla oluşturulan eksplantların dişeti ogmentasyonunda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Doku mühendisliği uygulamalarının başarılı olabilmesi ve fonksiyonel bir dokunun üretilmesi için biyomateryal seçimi önemlidir (28). Diş hekimliğinde hücre ekimi için farklı birçok biyomateryal kullanılmaktadır. Literatürde fibroblast hücreleriyle oluşturulan eksplantlar için kullanılan doku iskeleleri, benzil ester hiyaluronik asit(29), tip1 ve 3 kollajen (30, 31), poliglaktin meş (32, 33), aselüler dermal matriks allogrefti (ADMA) (34) ve kitosandır (35) .

Son zamanlarda plateletten zengin fibrin de sık kullanılan biyomateryaller arasında yer almakta ve araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Plateletten zengin fibrin (PZF) Choukroun ve ark.’ı tarafından geliştirilen, **‘ikinci jenerasyon lökosit ve platelet konsantrasyonu’** olarak tanımlanmıştır (36). Antikoagülan içermeyen tüplerde alınan kanın santrifüj edilmesiyle oluşturulan PZF, üç boyutlu fibrin ağı içerisinde birçok sitokin ve büyüme faktörü bulundurmaktadır (37). Bütünüyle otojen olan bu biyomateryalin immün reaksiyon riski taşımaması ve maliyetsiz oluşu avantajları arasındadır. Çalışmalar ve klinik tecrübeler PZF’nin erken yara iyileşmesini, kemik greftlerinin maturasyonu ve periodontal/peri-implant yumuşak dokuların estetiğini iyileştirdiğini göstermektedir (38). PZF’nin doku iskelesi olarak kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Gassling ve ark. (39) doku mühendisliği uygulamaları için

PZF membranların kollajen membranlara göre insan periosteal hücrelerinin proliferasyonu için daha üstün bir biyomateryal olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında (40) PZF ve kollajen membranlar ile PZF jelin insan osteoblast hücrelerinin ekimi ve proliferasyonu için uygun birer doku iskelesi olduklarını belirtmiş ve hücre proliferasyonunun PZF membranlarda diğer iki biyomateryale oranla daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Bilgilerimiz dahilinde, literatürde PZF ve kollajen membranlar üzerinde insan dişeti fibroblastlarının ekimiyle oluşturulan eksplantların histolojik olarak incelendiği ve karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın birinci amacı PZF membran ve kollajen membran üzerinde insan dişeti fibroblastı kültürü ile ex vivo oluşturulan iki greft materyalini histolojik olarak karşılaştırmaktır. İkinci amacı ise PZF membranın kollajen membran ile desteklenmesi durumunda büyüme hormonları içeren PZF'nin hücre proliferasyonuna etkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MUKOGİNGİVAL PROBLEMLER

Mukogingival problemler, dişeti ve alveol mukozasının, bazı durumlarda da alveol kemiğinin morfoloji ve fonksiyonunda oluşan çeşitli kayıplardır (41). En sık karşılaşılan mukogingival problemler yapışık dişeti genişliğinin yetersiz olması veya mevcut olmaması ve dişeti çekilmeleridir.

Mukogingival cerrahi, dişetin morfoloji ve konum bozuklukları ile miktarındaki yetersizliklerin düzeltilmesini hedefleyen periodontal cerrahi işlemleri kapsar (42). Mukogingival cerrahi terimi ilk olarak 1957’de Friedman tarafından öne sürülmüş ve dişetini korumak, anormal kas veya frenilum bağlantılarını ortadan kaldırmak ve vestibül derinliği artırmak amacıyla yapılan işlemleri tanımlamak için kullanılmıştır (43).

Amerikan Periodontoloji Akademisinin (AAP) 1996’da yapılan çalıştay sonrası yayınladığı bildiride kron boyu uzatma, kök yüzeyi örtme, vestibül derinleştirme, papil rekonstrüksyonu, kret koruma ve ogmentasyonu gibi çeşitli mukogingival prosedürler için ‘Periodontal Plastik Cerrahi’ terimi kullanılmıştır (44).

2.2. DİŞETİ ÇEKİLMELERİ

2.2.1. Dişeti Çekilmelerinin Tanımlaması

Dişeti çekilmesi, ‘dişeti kenarının mine-sement sınırının (MSS) apikaline doğru konum değiştirmesi sonucunda kök yüzeyinin açığa çıkması’ olarak tanımlanmaktadır (45, 46)

1979 yılında Maynard ve Wilson (47) dişeti çekilmesinin apikalindeki dokunun niteliğinin değişebilme ihtimali olduğundan dolayı “dişeti çekilmesi” yerine “marjinal

doku veya kenar çekilmesi” teriminin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Amerikan Periodontoloji Akademisi’nin (48) 1996’da yayınladığı raporunda, dişeti çekilmesi, kenar dokunun mine-sement sınırının apikalinde yer alması olarak tanımlanmış ve çekilmenin apikalindeki dokunun dişeti veya alveol mukozası da olabileceği ve bu nedenle “yumuşak doku çekilmesi” veya “kenar doku çekilmesi” ifadelerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir (48).

2.2.2. Dişeti Çekilmelerinin Sınıflandırılması

Klinik olarak dişeti çekilmeleri **periodontitise bağlı dişeti çekilmeleri** ve **vestibüler dişeti çekilmeleri** olarak iki gruba ayrılabilir.

Periodontitise bağlı dişeti çekilmeleri ilgili dişlerin tüm yüzeylerindeki periodonsiyumu ilgilendirir. Periodontal hastalıkla birlikte destek alveol kemiği yüksekliği azaldığında, dişeti de onunla birlikte apikale doğru yer değiştirir ve bu durum geri dönüşümsüzdür.

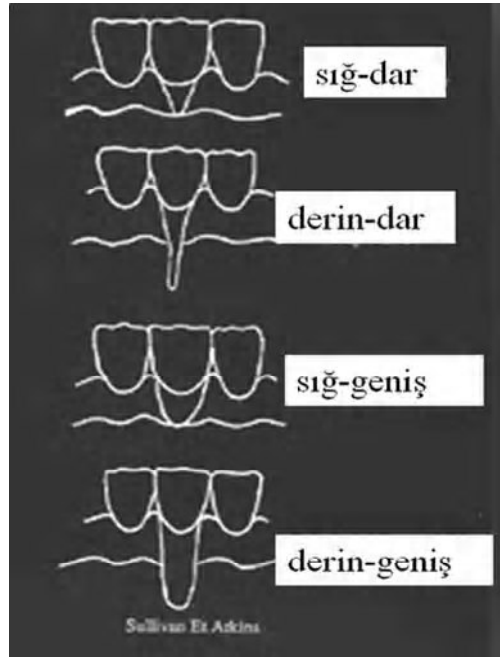
Vestibüler dişeti çekilmeleri ise ilgili dişlerin fasiyal yüzeylerini ilgilendirir ve etken periodontitis değildir. İnterdental kemiğin kaybı ile ilişkili olarak kısmen ya da tamamen periodontal plastik cerrahi ile tedavi edilebilir (49).

1966 yılında Ariaudo ve ark. yaptıkları çalışmada (50), dişeti çekilmelerini ilgili bölgenin anatomisine bağlı gerçekleştirilecek tedavi sonuçlarına göre üç sınıfa ayırmıştır. Sınıflama **tablo 2.1.**’deki gibidir.

Tablo 2.1. Ariaudo ve ark.’nın dişeti çekilmeleri sınıflaması (50).

Sınıf	Tanımlama
1	İlgili bölgede patolojik cep oluşumu gözlenmeksizin bütünüyle örtümü öngörülebilan açık kök yüzeyi
2	Çevre dişlerde kemik kaybı ve sık patolojik cep varlığı, kısmi kök örtümü öngörülebilan açık kök yüzeyi
3	Çekilme görülen ve komşu dişlerde derin patolojik cep varlığı , minimal kök örtümü ile birlikte mevcut durumun iyileştirilmesinin öngörüldüğü açık kök yüzeyi

Sullivan ve Atkins’ın (51) 1968 yılında yaptıkları çalışmada dişeti çekilmeleri sadece “derin-geniş”, “sık-geniş”, “sık-dar” ve “derin-dar” şeklinde tanımlanmıştır.



Şekil 2.1. Sullivan ve Atkins'ın dişeti çekilmesi sınıflaması (51).

Mlinek ve ark (52) 1973 yılında yaptıkları çalışmada, değerlendirmenin objektif olarak yapılabilmesi için mevcut sınıflamanın sayısal değerlerle desteklenmesi gerektiğini vurgulamış ve meziyo-distal ve apiko-kronal yönde 3 mm'yi geçmeyen defektleri “sığ-dar”, her iki yönde de 3 mm'yi geçen defektleri ise “derin-geniş” olarak tanımlamışlardır.

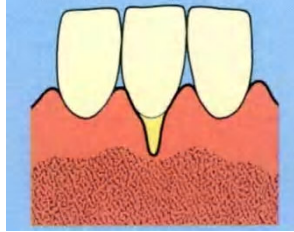
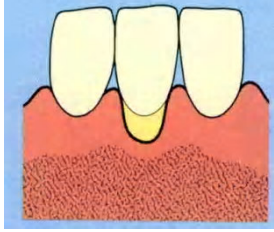
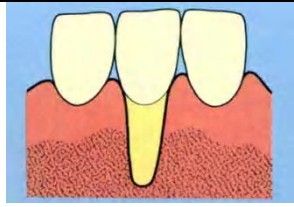
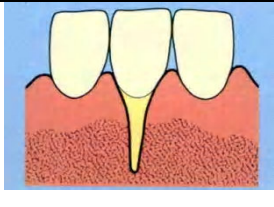
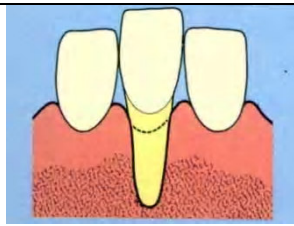
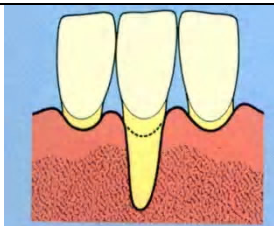
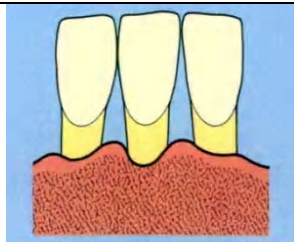
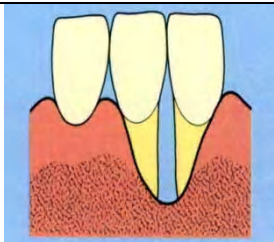
1985 yılında Miller (53), çekilme olan bölgenin mezial ve distalindeki interproksimal kemik ve yumuşak doku seviyesinin, kök yüzeyi örtümü için önemli olduğunu vurgulayarak yeni bir sınıflama yapmıştır. Bu sınıflama ile tedavi sonuçlarının öngörüsü oluşturulmaya çalışılmıştır. Sınıflama aşağıdaki gibidir:

Sınıf 1: Dişeti çekilmesi mukogingival sınırın koronalindedir. İnterproksimal bölgede kemik ve yumuşak doku kaybı yoktur. %100 kök yüzeyi örtümü beklenebilir.

Sınıf 2: Dişeti çekilmesi mukogingival sınırda ya da apikalindedir. İnterproksimal bölgede kemik ve yumuşak doku kaybı yoktur. %100 kök yüzeyi örtümü beklenebilir.

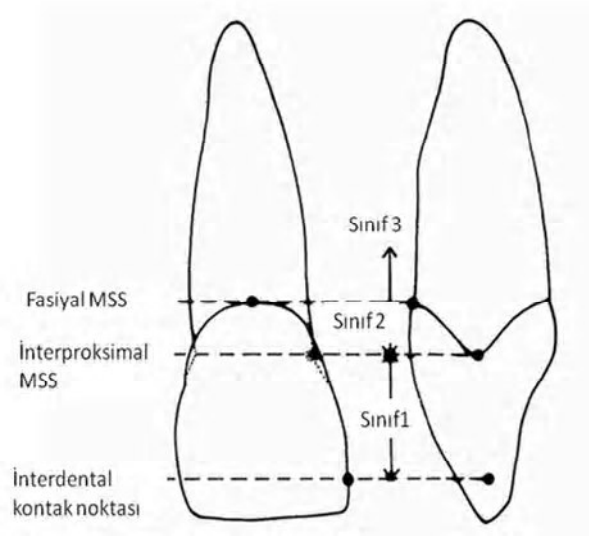
Sınıf 3: Dişeti çekilmesi mukogingival sınırda ya da apikalindedir. İnterproksimal bölgede kemik ve/veya yumuşak doku kaybı vardır. Kısmi kök yüzeyi örtümü beklenebilir.

Sınıf 4: Dişeti çekilmesi mukogingival sınırda ya da apikalindedir. İnterproksimal bölgede kemik ve/veya yumuşak doku kaybı vardır ve/veya dişte ileri derecede malpozisyon vardır. Kök örtümü beklenemez.

Sınıf 1		
Sınıf 2		
Sınıf 3		
Sınıf 4		

Şekil 2.2. Miller'in dişeti çekilmeleri sınıflandırması (53).

Nordland ve Tarnow'un 1998 yılında yaptıkları sınıflandırmada (54) ise mevcut papil miktarının kök örtümünde önemli bir kriter olduğu belirtilmiş ve sınıflandırma aşağıdaki şekilde yapılmıştır:



Şekil 2.3. Nordland ve Tarnow'un dişeti çekilmesi sınıflandırması (54).

Normal: Tüm dişeti embrasürünü dolduran dişeti papili varlığı.

Sınıf I: Papil tepesi dişlerin kontak noktası ile interproksimal mine-sement sınırının en koronal noktası arasında.

Sınıf II: Papil tepesi interproksimal mine-sement sınırında veya biraz apikalinde ancak fasiyal mine-sement sınırının koronalinde.

Sınıf III: Papil tepesi fasiyal mine-sement sınırında veya daha apikalinde.

Miller sınıflaması birtakım limitasyonlarının olmasıyla birlikte klinikte en sık kullanılan dişeti sınıflamasıdır. Zuchelli bu limitasyonların aşılmasını amaçlayıp Miller sınıflamasını modifiye etmiştir. Modifikasyonda Miller sınıf 2 çekilmeler apikalinde keratinize doku sınırı bulunduğu sınıf 2a, bulunmadığında ve çekilme mukogingival sınıra ulaştığında ise sınıf 2b olarak tanımlanmıştır.

2.2.3. Dişeti çekilmelerinin etiyolojisi

Dişeti çekilmeleri günümüzde farklı birçok faktörle ya da birkaç faktörün eş zamanlı olarak görülmesi ile ilişkilendirilmektedir. Bu faktörler aşağıda belirtildiği üzere gelişimsel ya da sonradan edinilmiş olabilir (4, 5, 55);

- Yapışık keratinize dokunun ince ve yetersiz olması
- Yetersiz vestibül derinlik
- Vestibüler alveoler kemiğin ince olması
- Frenilum çekmeleri

- Hastanın travmatik kötü alışkanlıkları
- Yanlış diş fırçalama
- Periodontal hastalıklar ve tedavileri
- Hekim hatalarına bağlı faktörler
- Okluzal travma
- İlerleyen yaş

Literatürde uzun yıllar süresince yeterli miktarda keratinize dişetinin dişeti çekilmelerini önleyeceği ve bu miktarın minimal 2 mm olduğu ileri sürülmüştür (56-58). Öte yandan bazı araştırmacılar (59-63), düzenli hekim kontrolüne giden ve ağız hijyeni yeterli olan bireylerde, keratinize dişetinin mevcut olmadığı ya da minimum miktarda olduğu durumlarda dahi dişeti sağlığının idame edilebileceğini savunmuşlardır. AAP'nin mukogingival cerrahi üzerine 1996'da yayımlanan raporunda (48) ise, dişeti çekilmesinin devamlılık gösterdiği, keratinize dişetinin yetersiz veya minimal olduğu bölgelerde, yumuşak doku ogmentasyonunun uygunluğu ve gerekliliği vurgulanmıştır (64). Vestibül derinliğin sığ olması ve yapışık keratinize dişetinin minimal olması bu alanlarda besin birikimine neden olur, diş fırçasının yerleştirilmesinde zorluk yaratır ve böylece ağız hijyeni olumsuz yönde etkilenir. Yeterli vestibül derinlik ve minimal yapışık keratinize dişeti varlığında ağız hijyen uygulamaları kolaylıkla yapılabilir ve dişeti sağlığı korunabilir ancak, minimum yapışık keratinize doku varlığında yetersiz vestibül derinlik mevcut ise dişeti sağlığının devam ettirilebilmesi mümkün görünmemektedir (65, 66).

Dişeti çekilmelerine sebep olan faktörlerden biri de gelişimsel (anatomik) veya kazanılmış(fizyolojik veya patolojik) (67) olan vestibüler alveoler kemikteki yetersizlikler veya durumlardır (68). Bunlar; alveol kemiğindeki fenestrasyon ve dehisensler, dişin ark içerisindeki yeri, dişin sürme sırasında takip ettiği kret dışı yol ve dişin morfolojisidir (69). Vestibüle yakın izlenen sürme yolu ya da komşu dişlere oranla dişin daha vestibülde konumlanması (70), diş kökünün genişliği ve alveol kret genişliği ile olan ilişkisi (71) dehisens oluşumunda etkilidir. Geniş ve kısa köklü dişler, uzun ve ince köklü dişlere oranla dehisens oluşumuna ve dişeti çekilmesine daha eğilimlidirler. Ortodontik kuvvetlerle dişin lingual ya da labial yönde hareket ettirilmesi sonucunda da dehisens meydana gelebilir. Bu durum sonradan edinilmiş faktörler arasında yer almaktadır (72).

Dişeti kenarına yakın pozisyondaki frenilum ataşmanları genellikle sığ vestibüle sahip bireylerde rastlanmaktadır. Serbest dişetin frenilum ataşmanı nedeniyle mobil hale geldiği koşullarda plak kontrolü yeterli düzeyde sağlanamayabilir ve bu bireylerde dişeti çekilmesi meydana gelebilir (57, 73). Bununla birlikte, yüksek frenilum ataşmanı ile dişeti çekilmesi arasında bir ilişkinin saptanamadığı çalışmalar da mevcuttur (74, 75).

Dişeti çekilmesinde rol oynayan hastanın travmatik kötü alışkanlıkları kapsamında yanlış diş ipi kullanımı (76), dişetini tırnakla itme (77), dudakta ve dilde piercing bulunması (78-80) gibi durumlardan bahsedilebilir. Plak kontrolü çok iyi olan kimi hastalarda dişlerin vestibül yüzeylerinde dişeti çekilmesi ve diş kolelerinde abrazyonla sonuçlanan travmatik diş fırçalama görülebilmektedir (81). Dişeti çekilmelerinde, kullanılan fırçanın kıl sertliğinin (82, 83), fırça kıllarının yuvarlatılmış ya da düz bitimli oluşunun (84) ve fırça ucu şeklinin (85) önemini vurgulayan çalışmalar mevcuttur. İltihabi olmayan lokalize dişeti çekilmelerinin oluşumu ve ilerlemesinde fırçalamanın etkisine ait mevcut verilerin değerlendirildiği bir sistematik derlemede, fırçalama sırasında uygulanan basıncın, fırçalama süresinin, fırçalama tekniğinin ve fırça kıllarının sertliğinin çekilmeye etkisi olduğu belirtilmiştir (86) .

Periodontal hastalık sonucunda oluşan alveolar kemik rezorpsiyonu dişeti çekilmelerine sebep olan patolojik bir faktördür. Kronik periodontitisli hastalarda ara yüzlerde meydana gelen ataşman kayıplarının ardından vestibül ve lingual yüzeylerdeki remodelasyon sonrasında yumuşak dokunun apikalde konumlanması söz konusu olabilir (87). Dişeti çekilmesi, periodontal yıkımla beraber oluşabileceği gibi, periodontal tedavi sonrasında dişetindeki ödemin ve cep derinliğinin azalması sonucu ya da rezektif cerrahi tedaviye bağlı olarak da görülebilir (8, 88, 89).

Biyolojik genişlik ihlal edilerek yapılan sabit protezler, kole restorasyonları, hatalı parsiyel protez planlaması ve okluzal uyumsuzluk gibi iyatrojenik uygulamaların da dişeti çekilmesine neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (6, 76, 90-93).

Yaşlanma ile tüm vücuttaki katabolik aktivite anabolik aktiviteye oranla fazlalaşır ve dokular atrofiye uğrar. Aynı durum dişetleri için de geçerli olduğundan dişeti çekilmeleri meydana gelebilir. Albandar ve Kingman'ın (94) dişeti çekilmesi prevalansını değerlendirdikleri bir çalışmada, 30 yaş üstü bireylerin %58'inde 1mm veya daha ileri dişeti çekilmesi olduğu ve bu miktarın yaş ile birlikte arttığı ifade edilmiştir. Benzer şekilde, farklı bir çalışmada (95) yaş ile dişeti çekilmesinin arttığı ve

aynı yaştaki bayanlarda erkeklere oranla daha az dişeti çekilmesine rastlandığı bildirilmiştir. Bu bulgular, Murray'ın (96) 4000 bireyi incelediği ve dişeti çekilmesin yaş ile arttığını bildirdiği çalışmanın bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

2.2.4. Dişeti çekilmelerinin meydana getirdiği sorunlar ve tedavileri

Serbest dişeti kenarının MSS'nin apikalinde konumlanması ve kök yüzeyinin açığa çıkmasıyla;

- Dentin hassasiyeti (4, 6-8),
- Mikrobiyal dental plak(MDP) birikimi ve enflamasyon oluşumu (6, 8),
- Kök çürüğü oluşumu (6, 9, 10),
- Estetik sorunlar (4, 8, 11),
- Hastanın dişini kaybetme korkusu (4, 6) gibi psikolojik problemler ortaya çıkmaktadır.

Dişeti çekilmesine bağlı olarak açığa çıkan kök yüzeylerinin sement ile örtülü olmadığı durumlarda dentin açığa çıkmaktadır. Dentin hassasiyeti, dişeti çekilmesi olan vital dişlerde kimyasal, termal veya ozmotik uyarana karşı meydana gelen kısa süreli oluşan ağrı olarak tanımlanan, klinik bir durumdur (97-100). Dentin hassasiyetinin giderilmesi için bazı kimyasal ajanlar kullanılabilmektedir. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (101):

- Flor içeren vernikler
- Oksalat içeren hassasiyet gidericiler
- Gluteraldehit içeren hassasiyet gidericiler
- Stronsiyum içeren hassasiyet gidericiler
- HEMA içeren hassasiyet gidericiler
- Kalsiyum fosfat
- Nano dolduruculu hassasiyet giderici

Bunlar dışında lazer kullanımı (102) ve cerrahi prosedürlerle kök örtümü sağlanması (20), dentin hassasiyetinin giderilmesi için uygulanan diğer yöntemlerdir.

Dentin hassasiyeti olan bireylerde ağız hijyeni uygulamaları güçleşir ve MDP birikimi artar. MDP birikimi ile oluşan ve süregelen dişeti enflamasyonu dişetin daha fazla

çekilmesine neden olabileceği gibi, ortamdan MDP'nin uzaklaştırılamaması sonucunda kök çürüğü riski de artabilir (6, 9, 10).

Dişeti çekilmeleri ile birlikte görülen enflamasyonun giderilmesi için, nedeni ortadan kaldırmaya yönelik tedavi uygulanır. Etken plak ve diştaşı ise; fazl tedavi, dentin hassasiyeti ise; hassasiyet tedavisi, vestibül sıgılık ise; vestibül derinleştirme operasyonu uygulanır (103). Dişeti çekilmesi ve yüzeysel kök çürüğünün bir arada bulunduğu dişlerde çürüğün temizlenmesi sonrasında uygun cerrahi yöntemle kök örtümü gerçekleştirilir (10, 104). Derin kök çürüklerinde ise; reçine bazlı cam iyonomer rezinler, flor salınımı, diş dokusu ile kimyasal bağlanma ve bağ dokusunun bu materyal üzerine ataşman sağlaması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmelidir (105).

Dişeti çekilmesinin gülme hattı sınırları içinde olması estetik bir sorundur (6, 106). Aynı zamanda yumuşak doku kaybını takiben dişlerin kron boylarının uzaması, hastalarda dişlerini kaybetme kaygısı oluşturmaktadır (4, 6).

Dişeti çekilmelerinin tedavileri, sadece yukarıda bahsedilen problemleri ortadan kaldırmaz aynı zamanda periodontal sağlığın idamesini de sağlar. Bu amaçlar doğrultusunda uygulanan cerrahi yöntemler Tablo 2.2.' de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Kök örtümü için uygulanan yöntemler.

KÖK ÖRTÜMÜ İÇİN UYGULANAN YÖNTEMLER
1.SAPLI GREFTLER
a. Laterale konumlandırılmış flep (LKF) (107, 108)
b. Kronale konumlandırılmış flep(KKF) (109)
c. Çift papil flep(110)
2. SERBEST GREFTLER
a. Serbest dişeti grefti (SDG) (51)
b. Bağ dokusu grefti (BDG)(14)
c. Aselüler dermal matriks allogrefti(ADMA)(111)
3. SAPLI VE SERBEST GREFTLERİN KOMBİNE UYGULAMALARI,
a. KKF-SDG (42)
b. LKF-BDG(112)
c. KKF-BDG (42)
d.Çift papil flep-BDG,(112)
f. Semilunar KKF (20, 113)
4. YÖNLENDİRİLMİŞ DOKU REJENERASYONU(YDR)
a. Rezorbe olmayan membran ile (114)
b. Rezorbe olan membran ile (115)
5. İLAVE TEDAVİLER
a. Kök yüzeyi demineralizasyonu (112)
b. Fibrin-fibronektin sistemleri (116)
c. Mine matriks proteinleri(EMD) (117)
d. Büyüme faktörleri (118)
6. DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI

Tablo 2.2.’de yer alan yöntemler arasında saplı fleplerle kombine olarak uygulanan bağ dokusu grefti kök örtümü tedavisinde altın standart olarak kabul görmektedir (12). 1980 yılında kret ogmentasyonu yöntemi için tanımlanan bu teknik (119), 1982 yılından itibaren kök örtümü tedavilerinde kullanılmaya başlanmıştır (13). Son derece yüksek öngörülebilirliği olan bu yöntem estetik açıdan serbest dişeti greftine göre daha iyi sonuçlar sağlamaktadır (13, 14). Bu yöntem ile greft, hem üzerine yerleştirildiği periosteum hem de üzerinin örtüldüğü flepten beslendiğinden dolayı başarılı bir kök

yüzeyi örtümü sağlanabilmektedir. Literatürde farklı saplı flep teknikleriyle kombine olarak kullanılan bağ dokusu greftlerinin avantajlarını ileri süren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (13-22). Bu tekniğin birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- İkinci bir yara bölgesi oluşturur.
- Teknik beceri gerektirir.
- Tekniğin başarı ile uygulanabilmesi için operasyon süresi uzayabilir.
- Palatinal doku yetersiz kalınlıkta ise yetersiz miktarda greft elde edilebilir.
- Süturları komplikedir.
- Greftleme sonrasında operasyon sahasında biyotipte kalınlaşma meydana gelebilir ve gingivoplasti gerekebilir.
- Donör sahada ağrı ve morbidite görülebilir.

Pini Prato ve ark.(120) 1993'te bağ dokusu greftinin bahsedilen dezavantajları sebebiyle, dişeti çekilmesi tedavisinde 'yönlendirilmiş doku rejenerasyonu'(YDR) yöntemini kullanmışlardır. Yöntem, membranın ağız içerisinde açıkta kalması iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyeceğinden dolayı koronale konumlandırılmış flep ile birlikte uygulanmaktadır.

2003 yılında yapılan bir meta analiz çalışmasında YDR prensipleri uygulanan 40 çalışma incelenmiş ve YDR tedavisi sonucu sınırlı kök örtümünün %75, tam kök örtümünün ise %42 oranında olduğu rapor edilmiştir. Rezorbe olan ve olmayan membranlar arasında kök örtümü açısından bir fark bulunamamıştır (121).

Kök örtümü tedavisinde ADMA kullanımı ilk olarak Dodge ve ark. (122) tarafından gerçekleştirilmiştir. Donör doku için ikinci bir cerrahi bölgeye ihtiyaç duyulmaması ve sınırsız greft kaynağı teşkil etmesi sebebiyle son yıllarda çoklu dişeti çekilmelerinin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (123-127). 2005 yılında yapılan bir meta-analiz çalışmasının sonuçları ADMA ile BDG'leri arasında kök örtümü, kazanılan keratinize doku miktarı, klinik ataşman seviyesi ve sondalama derinliği açısından fark olmadığını ileri sürmüştür (128). ADMA'nın kısa dönem kök örtümü başarısı BDG ile benzer olsa da, uzun dönemde boyutsal stabilitesini koruyamadığı gösterilmiştir (129). Bir başka çalışmada keratinize dişeti kazancı açısından BDG ve ADMA karşılaştırıldığında, BDG

ile daha başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (130) . ADMA'nın kadavralardan elde edilmiş olması ve olası bulaş riski bu yöntemin dezavantajıdır.

Yukarıda sözü geçen tüm tedavi yaklaşımları değişik derecelerde başarılı olmalarına rağmen her birinin uygulamada sınırlamaları bulunmaktadır (131-133). Bütün bu sınırlamalar kaybedilen dokunun ideal olarak nasıl yerine konulacağı sorusunu gündeme getirmiştir.

Mevcut yöntemlerin sınırlamalarını ortadan kaldıran ve kök örtümünde altın standart olarak kabul edilen tedavi yönteminin başarısını yakalayan farklı bir metodun arayışları devam etmektedir. Bu amaçla son yıllarda ağız içi dokuların rekonstrüksiyonunda kullanılabilecek doku mühendisliği ürünleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

1830'lu yıllarda Mathias Jacop Schliede ve Theodor Schwann tarafından ortaya konulan teori ile hücre; canlı sistemlerin örgütlenmesindeki biyolojik aktivite gösteren en küçük yapısal birim olarak tanımlanmış ve sonrasında doku ile ilgili çalışmalar başlamıştır (134).

“Doku mühendisliği” genel anlamıyla doku ve organların fonksiyonunu restore etmek, geliştirmek ve sağlığına yeniden kavuşturmak amacıyla biyoloji, tıp, diş hekimliği ve mühendislik dallarının birlikte çalıştığı multidisipliner bir bilim alanı olarak tanımlanmaktadır (23). Rejeneratif tıpta; yaşlanma, hastalık ve konjenital defektler gibi nedenler ile işlevlerini yitiren organ ve dokulara yeniden işlev kazandırılması veya bunların yeniden inşa edilmesi gibi yöntemler oldukça ilgi çekmektedir (135).

2.3.1. Doku mühendisliği stratejileri

Yeni bir dokunun oluşması için 3 stratejiden bahsedilmektedir (24):

- 1- İzole edilen hücrelerin infüzyonu,
- 2- Doku uyarıcı maddelerin (büyüme faktörleri) üretimi ve taşınması,
- 3- Hücrelerin matrikslerin üzerinde veya içerisinde konumlanmaları (implante edilmesi veya ekstrakorporeal aygıtların kullanılması ile).

2.3.1.1. İzole edilmiş hücrelerle tedavi

İşlev bozukluğu ve doku hasarı görülen alanda bu işlevden sorumlu hücrelerin canlıdan izolasyonu, *in vitro* besi ortamında üretilerek çoğaltılması(hücre kültürü) ve canlıya verilmesi bu doku mühendisliği yaklaşımını oluşturmaktadır. Ancak, hücrelerin immün reaksiyona neden olması ve infüzyon sonrasında hücrelerin işlevinin istenilen ölçüde devam ettirilememesi gibi problemler meydana gelebilir (136).

2.3.1.2. Doku gelişimini hızlandıran maddelerle tedavi: Bu doku mühendisliği yaklaşımında hedef doku gelişimini hızlandıran büyüme faktörü gibi maddelerin saflaştırılması, üretilmesi ve aktif salım sistemleriyle dokuya iletilmesi hedeflenir (136).

Doku mühendisliğinde büyüme faktörü uygulamaları; gerekli büyüme faktörünü doğal olarak sentezleyen veya genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin doğrudan doku iskelesine entegre edilmesi veya doku iskelesine dışarıdan uygulanması aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Büyüme faktörleri, polimer yapılı doku iskelelerine uygulandıklarında kontrollü salımları ve biyolojik etkinliklerinin uzaması sağlanabilir (137, 138).

2.3.1.3. Bir destek materyal üzerine ya da içerisine yerleştirilmiş hücrelerle tedavi:

Bu yaklaşımda hücrelere destek olabilecek doğal ya da sentetik polimer yapıda biyomateryaller kullanılmaktadır. Doğal polimerler çevre dokularla yüksek dereceli uyumluluk (biyouyumluluk=biyokompatibilite) sergilerler. Sentetik polimerler ise kolay elde edilebilme, uygulanabilme ve özelliklerinin iyileştirilebilmesi gibi avantajlarından dolayı tercih edilebilir.

Sonuç olarak, hazırlanan tüm doku mühendisliği düzenekleri hücre üremesini gerçekleştirmeli, mekanik direnç sahip olmalı ve kullanım amacına bağlı olarak, kalıcı ya da geçici destek görevini üstlenmelidir (136).

2.3.2. Doku mühendisliği çalışmalarında karşılaşılan güçlükler

Doku mühendisliği faydalı, ancak içeriği son derece kompleks olan bir uygulamadır. Uygulamadaki zorluklar aşağıdaki **tablo2.3**'de özetlenmiştir (28).

Tablo 2.3. Doku mühendisliğinde karşılaşılan güçlükler (28).

Doku mühendisliğinde karşılaşılan güçlükler		
Biyolojik zorluklar	Mühendislikteki zorluklar	Klinik zorluklar
Hücre kaynağı seçimi	Biyomateryal seçimi	Yeni dokunun uygun şekil ve hacimde oluşturulması
Hücrelerin çoğaltılması	Biyomoleküllerin verimli kullanımı	Yeni dokunun canlı dokuya adaptasyonu
Hücrelerin farklılaşma durumunun korunması	Fonksiyonel dokunun üretimi	Yeterli vaskülarizasyon

2.3.2.1. Biyolojik zorluklar

Doku mühendisliği uygulamalarında hücre kaynağının seçimi önem taşımaktadır. Otolog hücreler(canlının kendinden izole edilen hücreler), allojenik hücreler(aynı türe ait başka bireylerden izole edilen hücreler) ya da ksenojenik hücreler(farklı türlerden izole edilen hücreler) kullanılabilir. Otojen olmayan kaynaklardan elde edilen hücrelere karşı immün reaksiyonlar oluşabilmektedir. Bu nedenle otolog hücrelerin kullanımı daha uygun görünmektedir (139). Bununla birlikte, otolog hücrelerin izole edilmesinde enfeksiyon, fistül oluşumu ve deride skar oluşumu gibi kısıtlamalar mevcuttur (28).

Doku mühendisliğinde kullanılacak ideal hücrelerin kolay izole edilebilmesi, istenilen ölçüde çoğaltılabilmesi, immünojenik olmaması ve oluşturulması hedeflenen dokuya benzer protein ekspresyonuna sahip olması gerekmektedir (140).

Hücrelerin sayılarının ve farklılaşma durumlarının kontrol altında tutulabilmesi önemlidir. Yetersiz sayıda hücre üretiminin (141) ve fenotipin bozularak başka hücrelere farklılaşmanın rapor edildiği çalışmalar mevcuttur (142).

2.3.2.2. Mühendislikteki Zorluklar

Fonksiyonel bir dokunun üretilmesi için biyomateriyal seçimi önemlidir (28). Biyomateriyaller, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal/sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla(örneğin kan ile) temas ederler. Biyomateriyaller yalnızca implant olarak değil, ekstrakorporeal cihazlarda(vücut dışına yerleştirilen ama vücutla etkileşim halindeki cihazlar), çeşitli eczacılık ürünlerinde ve teşhis kitlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (28).

Doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskelelerinin hücrelerin ekimine, tutunmasına ve proliferasyonuna izin verecek 3 boyutlu yapıda olmasına, hücrelerin ekstrasellüler matriks oluşturmaya izin vermesine, yeni doku yeterli mekanik destek oluşturmaya ve istenen durumlarda biyoaktif moleküllerin salınmasına olanak sağlamasına ihtiyaç duyulur. Ayrıca biyomateriyallerde aranan diğer özellikler; biyouyumluluk, porlara sahip olma, su tutma, besin ve atık maddelerin taşınması ve çözünabilirliktir (140, 143-145).

Biyomateriyallerde uygun porlara sahip olma, besinlerin ve atıkların taşınması ve hücre canlılığının sürdürülebilmesi için önemlidir. Biyomateriyallerdeki por yapısı hücrelerin adezyonu ve proliferasyonu için gereklidir. Porların fazla olması mekanik desteği azaltabilirken, eksik olması da yukarıda sözü edilen fonksiyonların yetersizliğine neden olabilir (146, 147).

Çözünabilirlik, yapı iskelesinin yeni oluşan dokuya yerini bırakabilmesini sağlar. Yeni doku oluşumu ile çözünürlüğün eş zamanlı olması gereklidir. Çok hızlı gerçekleşen çözünme yeni oluşan dokuda hacim ve şekilde istenilen boyutun elde edilememesine yol açarken (148), yavaş çözünme yeni dokunun gelişimi için yer kalmamasına neden olur (149).

Birçok biyomateriyal kültür ortamında hücrelerin gelişimini yönetme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle bir yapı iskelesi için seçilecek ideal maddenin rejenerasyonu istenen dokunun çevresindeki hücre reseptörleri, büyüme ve farklılaşma faktörleri ve integrinler gibi biyoaktif moleküller ile etkileşim içine girebilmesi gerekmektedir (150) Biyoaktif moleküllerden en yaygın kullanılanlar büyüme faktörleridir. Büyüme faktörleri hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve matriks sentezini aktive ederek doku üretimini artırır (28).

“Biyouyumluluk” terimi, materyallerin biyolojik performanslarını belirtir ve biyouyumlu malzemeler, biyomateryal olarak adlandırılır. Biyouyumluluk; uygulama sırasında materyalin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneği olarak tanımlanmıştır (151). Biyouyumluluk yapı iskelesi için önemli bir özelliktir. Biyomateryalin veya onun çözünen ürünlerinin akut veya kronik inflamatuvar bir immün yanıtı yol açmaması gerekmektedir (152).

En sık kullanılan biyomateryaller; polilaktik-glikolik asit kopolimerleri (153-155), kollajenler (155, 156), poli-fosfazenler (157), poliüretanlar (158), polikaprolakton (159), polietilenglikol (160), poli (propilen fumarat) (161), nişasta bazlı materyaller (162), aljinat (163), ipek (164), biyoaktif cam ve cam seramikler (165), kalsiyum fosfat seramikler (166), kalsiyum fosfat-kollajen karışımları (156) ve sentetik polimer/apatit kompozitler (167) olarak sayılabilir.

2.3.2.3. Klinik zorluklar

Doku mühendisliği ürünü olarak oluşturulan yeni dokuya, arzu edilen şekil ve hacmin kazandırılması, çevre dokuya adaptasyonu ve yeterli oranda vaskülarizasyonu klinikte sıklıkla karşılaşılan problemlerdir (146).

2.3.3. Diş Hekimliğinde Doku Mühendisliği Stratejileri

Kaybedilen ya da hasar gören dokuların tedavisinde, doku mühendisliği uygulamalarını gerçekleştirmek için diş hekimliğinde benimsenen stratejiler, doku kondüksiyonu, doku indüksiyonu ve hücre nakli olmak üzere 3 ana grup altında sınıflandırılmaktadır (168). Gen tedavisi genellikle doku mühendisliği yaklaşımlarına örnek olarak kabul edilmese de, farklılaşabilen hücrelerle yapılan gen transferi doku mühendisliğinde dördüncü bir strateji olarak sayılabilir (169).

2.3.3.1. Gen tedavisi

Bu yöntem ilk olarak şiddetli immün yetmezliğe sahip kalıtsal adenoazin deaminaz (ADA) enziminin azaldığı iki hastanın tedavisi için kullanılmıştır. Bu hastalar için uygulanan metod ‘ex vivo gen tedavisi’ olarak adlandırılmıştır. ADA genleri laboratuvar ortamında lenfositlere aktarılmış ve modifiye edilen bu hücreler yeniden hastalara nakledilmiştir (169, 170)

Alveol kemik oluşumu için gen tedavisi kullanılarak Kemik Morfojenik Protein (BMP) gibi büyüme faktörlerinin iletimi sağlanabilir. BMP’ler kırık ve kemik oluşumunda

düzenleyici olarak önemli rol oynamaktadırlar. Son dönemde yapılan çalışmalarda, diş gelişimi ve periodontal dokunun onarımında BMP'lerin görev aldığı gösterilmiştir. Dum ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, 1. molar dişin çekim soketine yerleştirilen implantın çevresine adenovirus vektörünün içinde BMP-7 uygulanmış ve alveol kemiğinde ve implant çevresinde istenilen tamirin gerçekleştiği gözlemlenmiştir (171).

Gen transferi yöntemindeki başlıca sorun, taşıyıcı hücelere gerekli genleri sağlamak için sıklıkla modifiye edilmiş virüslerin kullanılmasıdır ancak her virüsün bazı yan etkilerinin var olmasıdır (172, 173)

Gen terapisinin, kraniofasiyal bölgede baş boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılması ileri zamanlarda klinisyenlerin bu tedavi metodunu kanser tedavilerinin standart bir parçası olarak kullanacaklarını düşündürmektedir (131, 174).

2.3.3.2. Doku İndüksiyonu

Doku indüksiyonunda, oluşması hedeflenen dokunun çevresindeki hücreler, gelişim faktörü adı verilen ve yeni kemik ve damar oluşumunu sağlayabilen moleküllerin yardımı ile, spesifik sinyallerle aktive edilirler. Doku indüksiyonunun temelini, yeni kemik (osteogenezis) ve kan damarı gelişimini (anjiogenezis) (175) sağlayan büyüme faktörlerinin bulunması ile oluşturmaktadır. Küçük partiküller haline getirilen kemiğin yeni kemik oluşturduğu gösterildikten sonra (176), kemik partiküllerindeki aktif maddeler ayrıştırılmış ve bu maddeleri kodlayan genlerin kopyalanması sonucunda Kemik Morfojenik Proteinleri (BMPs) üretilmiştir (177). BMPler, kemik, kırık ve periodontal dokuların rejenerasyonunda etkilidir. Anjiogenezisi sağlayan spesifik moleküllerin bulunmasının sonrasında yeni damar indüksiyonu sağlanmıştır (178).

Doku indüksiyonu stratejisindeki bir diğer yaklaşım da, oluşumu istenen doku için destek görevi görece yapı iskelesi içerisinde spesifik hücreler arası sıvı moleküllerinin konumlandırılmasıdır. Bu moleküller o alanda bulunan hücrelerin fonksiyonunun sağlanmasında ve hedeflenen doku tipinin yapılandırılmasında rol almaktadırlar (179, 180). Domuz kaynaklı diş minesini proteinlerinin periodontal yıkımın görüldüğü alanlarda yeni kemik oluşumu için kullanılması bu yaklaşıma bir örnektir (181).

Doku indüksiyonunun başarısı hasarlı dokuya yerleştirilen uygun faktörün, uygun dozda ve yeterli süre kalabilmesi ile sağlanabilir. Ancak bu proteinlerin etkinliği vücuttaki

yarılanma ömürlerinden dolayı kısıtlıdır. Bu nedenle, bu proteinlerin kontrollü salımları üzerine çalışılmaktadır (182).

2.3.3.3. Doku kondüksiyonu

Doku kondüksiyonu, doku mühendisliği teknikleri arasında inaktif bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Bu teknikte, yaşayan hücreler ya da biyolojik sinyaller kullanılmaz. Periodontal destek yapıların yeniden elde edilmesi amacıyla uygulanan yönlendirilmiş doku rejenerasyonu bu teknik için bir örnektir. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu epitel ve bağ dokusunun defekt bölgesine göçünü engellemek için bariyer membranının kullanıldığı bir metoddur (168, 179, 183).

2.3.3.4. Hücre Nakli

Hücre nakli tekniğinde, laboratuarda çoğaltılan hücreler ve rezorbe olabilen doku iskelelerinden faydalanılmaktadır. Biyopsi örneklerinden izole edilen hücrelerin rezorbe olabilen porlu polimer yapı iskeleleri üzerine yerleştirilmelerinden sonra, iskele yapısına tutunarak prolifer olmaları beklenir. Laboratuvarda gerçekleştirilen bu yöntemde, yapı iskelesi ve prolifer olan hücreler zamanla başka bir hastaya veya vericiye nakledilmeye hazır bir dokuya (eksplant) dönüşürler. Bu dokular gelecekte kullanılmak üzere saklanabilir (184).

Hücre nakli, oluşumu istenen doku için gerekli olan biyoaktif moleküller bilinmediğinde veya dokunun yenisiyle değiştirilmesinin acil olduğu koşullarda tercih edilmektedir (184).

Hücre nakli yönteminin de kısıtlamaları mevcuttur. Bazı dokulardaki hücrelerin çoğaltılması henüz mümkün olmadığından(örneğin; tükürük bezindeki asiner hücreler, pankreastaki adacık hücreleri) (169, 179), bu dokular hücre nakli ile rehabilite edilememektedirler.

Hücre nakline sıklıkla deri rekonstrüksiyonunda, yanıkta ve diyabetik ülser hastalarının tedavisinde ihtiyaç duyulmaktadır (179). Oral mukozanın yenilenmesi için de benzer yaklaşımlar geliştirilmiştir (185) .

2.3.4. Maksillo Fasiyal Bölgede Doku Mühendisliği Uygulama Alanları

Doku mühendisliği uygulamalarından oral ve maksillofasiyal bölgedeki kayıp dokuların rejenerasyonunda faydalanılmaktadır. İleri periodontal hastalıklar, alveol kemiğini de içeren yıkımlara sebep olabilmektedir. Mizuno ve ark.'nın (186) yaptığı bir çalışmada, erişkin melez köpeklerin mandibulalarından izole edilen periosteal hücrelerin kültürü gerçekleştirilmiştir. Proliferasyon sonrası elde edilen otolog periost grefti hasarlı bölgeye sutüre edilerek mandibular premolar bölgede iyileşme beklenmiştir. Üç ay sonunda iyileşme alanı radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiş ve bu tedavi yönteminin etkin ve güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Diş çekimi sonrasında çekim soketinde alveoler kemik kaybı gözlenmektedir. Alveoler kemikteki boyutsal dejenerasyon implant tedavisini güçleştirebilmektedir. İmplant yerleştirme öncesinde ya da sırasında alveoler kemikteki kaybın giderilmesi için uygulanan bazı metodlar morbiditeye neden olabilmektedir (168). Bu nedenle kemik-implant ilişkisini optimum düzeye taşımak için farklı doku mühendisliği metodları araştırılmaktadır (187). Chen ve ark. (188) doku mühendisliği ile kompozit yapı iskelesi üzerinde oluşturdıkları kemik greftini kullanarak tek aşamada yerleştirilen implant çevresinde yeni kemik oluşumunu histolojik olarak gözlemlemişlerdir. Hibi ve ark distraksiyon osteogenezi ile birlikte otojen mezenkimal kök hücre kültürü, trombin ile aktive edilmiş trombosit zengin plazma (PRP) ve kalsiyum klorid kullanımının mandibulada üç boyutlu kemik elde edilmesinde ve iyileşme süresinin kısaltılmasında faydalı olduğunu bildirmişlerdir (189). İto ve ark melez köpeklerin iliak kemiklerinden izole ettikleri mezenşimal kök hücreler ile birlikte fibrin yapıştırıcısı ve PRP'den elde ettikleri greft materyalinin implant çevresinde kemik rejenerasyonuna katkıda bulunduğu rapor etmişlerdir (190). Sauerbier ve ark. (191) insan kemik mezenşimal kök hücrelerinin, sığır kaynaklı kemik partikülleri ile birlikte kullanıldığında implant etrafında yeterli kemiği oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yamada ve ark'nın kemik-implant ara yüzeyini inceledikleri çalışmalarında, kemik mezenşimal kök hücreleri ile birlikte kullanılan trombosit zengin plazmanın daha fazla kemik-implant yüzey temas alanı elde edilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (192, 193). Xu ve ark.'ları (194) plasental kök hücrelerinin in vitro ortamda altın standart kabul edilen kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerinden yaklaşık 3 kat daha fazla kemik dokusu üretebildiğini bildirmişlerdir. Kalsiyum fosfat siman ile birlikte kitosanın bu hücreler

için iyi bir taşıyıcı yapı iskelesi olduğunu ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. Marei ve ark'nın (195) tavşanlarda çekim soketlerindeki iyileşmeyi histolojik ve radyografik olarak inceledikleri çalışmalarında, soketlere uyguladıkları poli-L-laktik asit:poliglikolik asit kompozit (PLG) esaslı yapı iskelesi üzerine kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinin geleneksel yöntemlere göre daha yoğun kemik rejenerasyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir. Schmelzeisen ve ark. dişsiz atrofik posterior maksillada, uygun bir matriks üzerine periost kaynaklı osteoblast hücreleri yerleştirerek elde ettikleri eksplantı sinüs yükseltme operasyonunda kullanmışlardır. Aynı bölgelere 4 ay sonunda implant yerleştirilirken elde edilen kemik biyopsileri histolojik incelemesi kemik rejenerasyonunu ortaya koymuştur (196). Diğer yandan, Zizelman ve ark. otojen kemik greftiyle yaptıkları sinüs yükseltme işleminde osteoblast ekili yapı iskelesi kullanarak yaptıkları sinüs yükseltme işlemine göre operasyon sonrası kemik rezorpsiyonunun daha az olduğunu bildirmişlerdir (197).

Temporomandibular eklemden meydana gelen kıkırdak yıkımı ağrıya ve hasta konforunun azalmasına neden olmaktadır. Bu konudaki son doku mühendisliği çalışmaları kıkırdak ve fibrokartilajın klinik olarak yeterli düzeylerde üretilebildiğini göstermiştir. Dejenere olmuş kıkırdağın tedavisi, kök hücre ve büyüme faktörlerinin uygun yapı iskeleleri ile birlikte uygulanması ile gerçekleştirilebilmektedir (198).

Tükürük bezlerindeki fonksiyon eksikliği hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir durumdur. Tükürük bezi dokusunun fonksiyon kaybı, baş boyun bölgesinin radyasyon tedavisi veya Sjogren sendromunun bir sonucu olarak ortaya çıkabilir (199). Ağız kuruluşuna karşı kullanılan mevcut tedaviler arasında yapay tükürük ve salgı artırıcı ilaçlar mevcuttur ancak bu yöntemlerle hasarlı doku tamir edilememektedir. Bu nedenle yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (200).

Pena ve arkadaşları farelerde fibrin yapıştırıcılı yapı iskelesi üzerine fibroblast ve keratinositlerle oluşturdukları otojen oral mukoza benzeri dokunun rejeneratif kapasiteli ve klinik olarak uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir (201). Bayar'ın yaptığı bir çalışmada (202) vücut dışında insan ağız mukozası eşdeğeri üretmek amaçlanmış, biyopsi örneğinden elde edilen insan ağız mukozası keratinositleri kültür ortamında çoğaltılarak kadavradan elde edilmiş deri matriksi üzerine ekilmiştir. Histolojik olarak 11. günde, vücut dışında üretilmiş ağız mukozası eşdeğerinde, bazal, suprabazal ve parakeratinize tabakalardan oluşan çok katlı bir epitel gelişimi gözlenmiştir.

Sıklıkla karşılaşılan periodontal problemlerden biri de dişeti çekilmeleridir. Son yıllarda kaybedilen dişeti dokusunu yeniden kazanmaya yönelik farklı yapı iskeleleri ve hücre tiplerinin kullanıldığı doku mühendisliği çalışmaları yapılmaktadır. Maia ve ark yaptıkları in vitro bir çalışmada asellüler dermal matrixin dişeti fibroblastları için bir yapı iskelesi olma ihtimali incelenmiştir. Fibroblast morfoloji ve dağılımın incelendiği çalışmada dişeti fibroblastlarının sadece matriksin yüzeyine yapıştığı, üç boyutlu bir üreme olmadığı ve ADMA'nın dişeti fibroblastlar için iyi bir yapı iskelesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (203).

Bununla birlikte Jhaveri ve ark.'nın insanlarda yaptıkları koronale konumlandırılmış fleple birlikte BDG ve otojen fibroblast ekili ADMA'nın, kök örtümündeki başarısının karşılaştırıldığı bir bölünmüş ağız çalışmada, kök yüzeyi örtümünün her iki yöntemle de sağlanabildiği ve söz konusu eksplantın kullanımının alternatif bir yöntem olabileceği bildirilmiştir (34). Saczko ve ark. (26) dişeti ogmentasyonunda kullanılabilecek bir eksplant elde etmeyi hedefledikleri çalışmalarında, enzimatik olmayan yollarla izole edilen insan dişeti fibroblastlarının kollajen membranlar üzerine ekilmeleriyle elde edilen eksplantların başarıyla uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

Berahir ve ark. sferoid sistemleri kullanarak hücre-matriks etkileşiminin gerçekleştiği 3 boyutlu hücre kültürü yaparak, periodontal fibroblast sferoidlerinin sentetik ve kollajen bazlı membranlarla etkileşimlerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları sonunda periodontal fibroblast sferoidlerinin her iki membrana da adezyon gösterdiğini, hücrelerin sferoidlerden membran iskeletlerine hem vertikal hem de horizontal olarak prolifer olup göç edebildiğini göstermiştir (204) .

Dominiak ve ark. kollajen membran üzerinde keratinize dişetinden elde ettikleri insan fibroblastlarını içeren eksplantları maksiller ve mandibular anterior bölgede bulunan mukogingival problem tedavisinde kullanmışlar ve sonuçları klinik ve histolojik olarak incelemişlerdir. 6 aylık gözlem periyodunda dişeti çekilmesinin azaldığı, histolojik olarak 12. haftada keratinize epitelle örtülü olgun bağ dokusunun mevcut olduğu ve hiçbir örnekte enflamatuar reaksiyon bulunmadığı saptanmıştır. Klinik incelemenin sonucunda kollajen membran üzerindeki insan fibroblast kültürünün dişeti ogmentasyonu için etkili ve estetik bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Eksplantlar 12 hafta içerisinde tamamen re-epitelize olup normal doku ile yer değiştirmişlerdir (27).

Rothamel ve ark. (205) farklı çapraz bağ yapısına sahip kollajen membranların insan periodontal ligament (PDL) fibroblastları (1) ve insan osteoblast benzeri hücre (2) kültürlerindeki biyouyumluluğunu değerlendirmişlerdir. Bu amaçla *Bioguide (BG)*, *Biomend (BM)*, *Ossix (OS)* ve *Tutudent (TD)* membranları kullanılmıştır. Kültür flasklarına ekilen hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 7 günlük hücre kültür süresinin ardından milimetre karedeki hücre sayısı ve hücre yoğunluğu değerleri karşılaştırılmış ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak hücre morfolojileri de değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları fibroblast sayısı açısından pozitif kontrol>BG=OS>TD>BM olarak belirtilirken, osteoblast benzeri hücre sayısı açısından pozitif kontrol>BG=TD>OS>BM'dir. Araştırmacılar BG, TD ve OS üzerine insan PDL fibroblast ve insan osteoblast benzeri hücre ataşmanın ve proliferasyonunun gerçekleştiğini fakat aynı durumun BM için söz konusu olmadığını belirtmişlerdir.

Köseoğlu ve ark. (206) 12 aylık takip yaptıkları bir çalışmada, Miller sınıf 1 çekilmeye sahip 22 kanin/premolar dişte, dişeti fibroblastlarının ekili olduğu kollajen membran/KPF tekniğinin kollajen membran/KPF tekniğine göre anlamlı oranda daha fazla kök örtümü sağladığını ancak dişeti kalınlığı açısından iki teknik arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.

2.4. PLATELETTEN ZENGİN FİBRİN

Enflamatuvar sürecin düzenlenmesi ve iyileşmenin artırılması, klinik araştırmacıların karşılaştığı büyük güçlüklerin arasında yer almaktadır. İyileşmeyi artırıcı yönde yapılan her müdahale sonucu, bilimadamları karmaşık remodelasyon olayları ile karşılaşmaktadırlar (36). Bu sebeple diş hekimleri cerrahi sonrası iyileşme sürecinde öngörülebilirlikle beraber rejenere olan kemik hacmini de artıracak son nokta arayışı içindedirler (38).

2.4.1. Geçmişten Günümüze Platelet Konsantreleri

Platelet konsantreleri ilk olarak trombopeniye bağlı hemorajilerin tedavi ve önlenmesinde kullanılmıştır. Kandan elde edilen ürünlerin yara örtümü ve iyileşmeyi stimüle edici etkileri için kullanımı, ilk kez 40 yıl önce konsantre fibrinojen içeren fibrin yapıştırıcılarının kullanımı ile başlamıştır. Hastadan veya ticari olarak elde edilebilen bu adezivlerin kullanımları hastalık taşıma riski, karmaşık ve maliyetli üretim protokolleri sebebiyle kısıtlanmıştır (207, 208).

Bu nedenle geçtiğimiz 20 yıl içinde platelet konsantrelerinin iyileşmeyi artırıcı etkileri ve fibrin yapıştırıcıları yerine kullanımları araştırılmıştır. Plateletten zengin plazma (PZP) ilk kez 90'lı yılların başında *plazmaferez* ve PZP sekestrasyon olarak tanımlanmıştır (209). PZP küçük hacimdeki plazmada insan plateletlerinin otolog konsantresidir (210). PZP kan pıhtısı %4 kırmızı kan hücresi(KKH), %95 platelet ve %1 beyaz kan hücresi (BKH) içerir (38). İlave olarak, PZP plateletler tarafından aktif olarak salgılanan temel protein büyüme faktörleri konsantrasyonunu içerir. Plateletler bu sayede kandaki diğer proteinlerle birlikte yara iyileşmesini başlatmak için adezyon molekülleri olarak etki gösterirler, bağ dokusu oluşumu, epitelyal göç ve kemik oluşumu için matriks işlevi görürler (210). Bu özellikleri ile, PZP güvenilir, ucuz maliyetli ve kolay hazırlanabilen otolog bir üründür. PZP antibakteriyel özelliği ile hastalık bulaşmasını ve immün reaksiyon gelişim riskini elimine eder (209). Elde edilen PZP antikoagüle durumda, 8 saat stabil ve steril kalır. Bu özelliği uzun cerrahi işlemlerde avantaj sağlar (211). Ancak, sığır trombinine karşı nadir de olsa görülen reaksiyonlar kullanılan trombin dozunun azaltılmasına ve daha hassas saflaştırma işlemlerinin uygulanmasına sebep olmuştur (209). Ayrıca, geleneksel PZP'nin yetersiz mekanik özellikleri klinik pratikte kullanımını zorlaştırmakta ve spesifik bölgelerde sabitlenmesini gerektirmektedir (212). PZP, çevre dokudan hücre göçü olmadan evvel büyüme faktörlerini hızlı şekilde saldığı için kemik rejenerasyonunda kısıtlı sitümlasyon potansiyeline sahiptir (213).

Fransız yasalarında yer alan, kandan elde edilen ürünlerin reimplantasyonu ile ilgili kısıtlamaları aşmak için, fibrin yapıştırıcısı ya da, klasik platelet konsantrelerine benzemeyen, yeni bir platelet konsantresi ailesi geliştirilmiştir. Bu yeni biyomateriyal, plateletten zengin fibrin (PZF) olarak adlandırılan otolog sikatrisiyel matriks benzeri yapıdır (36, 207).

2.4.2. Plateletten zengin fibrin (PZF)

PZF 2001 yılında Fransa'da Choukroun ve ark. tarafından geliştirilen, yumuşak ve sert doku iyileşmesini hızlandırmada kullanılan ikinci jenerasyon platelet konsantresidir. Otolog lökosit ve plateletten zengin fibrin biyomateriyal olarak tanımlanır (38, 214).

PZP'ye göre hazırlama/uygulama kolaylığı, düşük maliyet, biyokimyasal modifikasyona ihtiyaç duyulmaması(sığır trombinini veya antikoagülan kullanımı gerektirmemesi) PZF'nin avantajları olarak sayılabilir (38).

PZF ile fibrin pıhtı içerisinde plateletlerin toplanması ve sitokin salımı gerçekleştirmeleri sağlanmaktadır. Bu pıhtıda birçok iyileşme ve immünite sağlayan ajan bulunmaktadır. Direkt olarak pıhtı şeklinde kullanılabileceği gibi sıkıştırılarak membran şeklinde de kullanılabilir (38, 214).

2.4.2.1. PZF çeşitleri

2.4.2.1.1. Lökositten fakir veya saf plateletten zengin fibrin(S-PZF) konsantresi

Cascade Medikal'in ürettiği '*Fibrinet*' plateletten zengin fibrin matriks (PZFM) kiti 2 tüp içerir. Transfer aparatı ile birlikte bu tüplerin biri kanı toplamak için, diğeri ise PZFM pıhtısı içindir. Trisodyum sitrat(antikoagülan) içeren toplama tüpüne yaklaşık olarak 9 ml kan alınır, üretici tarafından sağlanan ayırıcı jelle birlikte yüksek hızda 6 dakika santrifüje edilir.Üç tipik KKH tabakası, açık sarımsı-kahverengi tabaka ve plateletten fakir plazma (PFP) elde edilir. Açık sarımsı-kahverengi tabaka ve PFP kalsiyum klorit içeren ikinci tüpe özel tasarım tüp bağlantı sistemi ile alınır.

Kalsiyum klorit pıhtılaşma sürecini başlatır . Tüp derhal 15 dakika süre ile santrifüje edilir. Bu süre sonunda PZFM elde edilmiş olur. Ayırıcı jel sayesinde elde edilen yapıda çok düşük miktarda lökosit bulunur. Platelet toplama etkinliği oldukça yüksektir. İşlem süresince plateletlerin korunması kabul edilebilir seviyededir. *Fibrinet* PZFM'deki fibrin matriks PZP'den daha yoğun ve daha stabildir. Bu durum muhtemelen ikinci santrifüj basamağındaki statik PZP polimerizasyonuna göre daha etkili olan dinamik pıhtılaşmadan kaynaklanmaktadır. Günlük kullanımda bu yöntemle eş zamanlı çok miktarda örneğin elde edilmesi oldukça güç ve pahalıdır. Ek olarak *Fibrinet* PZFM kullanımının etkinliğini gösteren çalışma bulunmamaktadır (208).

2.4.2.2.1. Lökosit ve plateletten zengin fibrin(L-PZF)konsantresi(Choukroun 'un PZF'si) (215)

Choukroun'ın PZF protokolü oldukça basit ve kolay bir tekniktir. PZF hazırlanması için santrifüj cihazı, 24 gauge'lik kelebek iğne içeren toplama kiti ve 9 ml'lik kan toplama tüpleri gerekmektedir. Kan antikoagülansız tüplere alınarak derhal 3000 devirde (yaklaşık 400g) 10 dakika santrifüje edilir (201). Birkaç dakika içerisinde antikoagülan yokluğuna bağlı örnek içindeki plateletlerin büyük çoğunluğu aktive olarak koagülasyon zincirini başlatır. Başlangıçta fibrinojen, tüpün üst kısımlarında konsantre olur. Bu durum dolaşan trombin fibrinojeni fibrin ağına dönüştürene kadar devam eder.

Sonuç olarak tüpün orta kısmında plateletleri içeren fibrin pıhtı tabakası, bu tabakanın üstünde asellüler plazma altında ise kırmızı kan hücreleri bulunur. Fibrin pıhtı tabakası alınır ve bu tabakaya yapışık olarak gelen kırmızı kan hücreleri kazınarak uzaklaştırılır. PZF pıhtısı PZF kutusundaki delikli plakaya yerleştirilir. Kapağı üzerine örtülüp sıkıştırılır. Böylece 1 dakika içerisinde otolog fibrin membran ekonomik şekilde elde edilir. PZF kutusu ile eşit kalınlıkta membranlar elde edilirken, membranın dehidrate olması da engellenmiş olur. PZF kutusunun delikli plakası altında toplanan serum eksuda içerisinde, fibrin pıhtı tarafından eksprese edilen zengin proteinlerden olan vitronektin ve fibronektin bulunur. Kutunun tabanında toplanan eksuda greft materyallerini hidrate etmede, cerrahi sahayı yıkamada, ve otolog greftleri saklamada kullanılabilir (38).

PZF elde etmede alternatif diğer yol ise fibrin pıhtısını spanç arasına yerleştirip, sıkarak sıvı kısmın uzaklaştırılmasıdır (207).

PZF pıhtısı PZF kutusu içindeki silindire yerleştirilip piston aracılığı ile sıkıştırılarak tıkaç veya 1 cm çaplı küçük PZF diskleri elde edilebilir. Bu diskler çekim sahalarını korumada kullanılabilir.

PZP'den farklı olarak, Choukroun'un PZF'si uygulamadan sonra süratle çözünmemektedir. Güçlü fibrin matriks kan pıhtısına benzer şekilde yavaşça remodelasyona uğrar. Plateletler ve lökositler bu metodla yüksek verimlilikte toplanır. Lökositler süreç boyunca korunur. Bu tekniğin bir diğer avantajı ise düşük maliyeti ve kolaylığıdır. Bu sayede çok miktarda PZF hızlı ve doğal olarak elde edilebilir. Bu metod günümüzde pratik kullanım için en uygun yöntemdir (208).

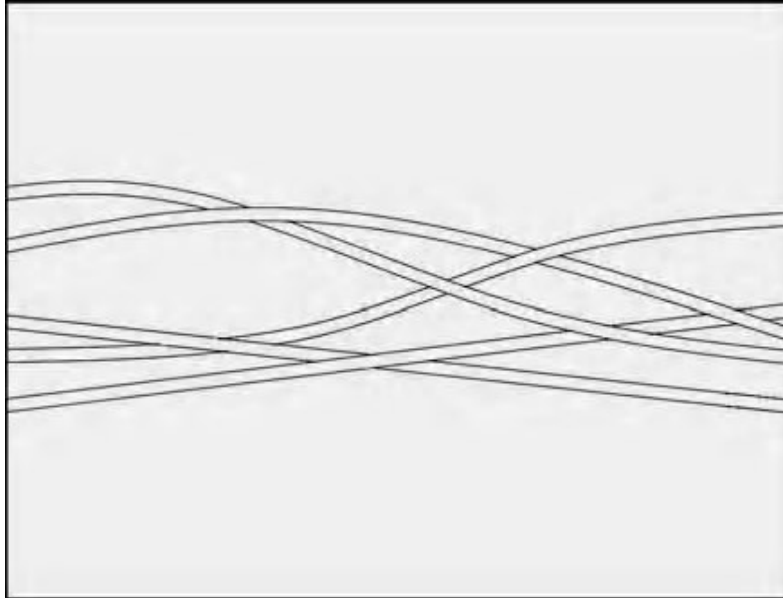
2.4.3. Farklı polimerizasyonlar, farklı biyolojiler

Fibrin yapıştırıcılar, konsantre PZP ve PZF arasında ana farklar jelleştirme safhasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Fibrin adezivler ve konsantre PZP eldesinde, sığır trombini ve kalsiyum klorit koagülasyonun son safhalarını başlatmak ve ani fibrin polimerizasyonunu sağlamak için kullanılmaktadır. Reaksiyonun hızı yukarıda belirtilen maddelerin eklenmesi ile belirlenir. Hemostatik fonksiyonlara bağlı olarak işlem sırasında hemen hazırlanmalıdırlar. Bu işlem için çok miktarda trombin kullanımı gerekebilmektedir.

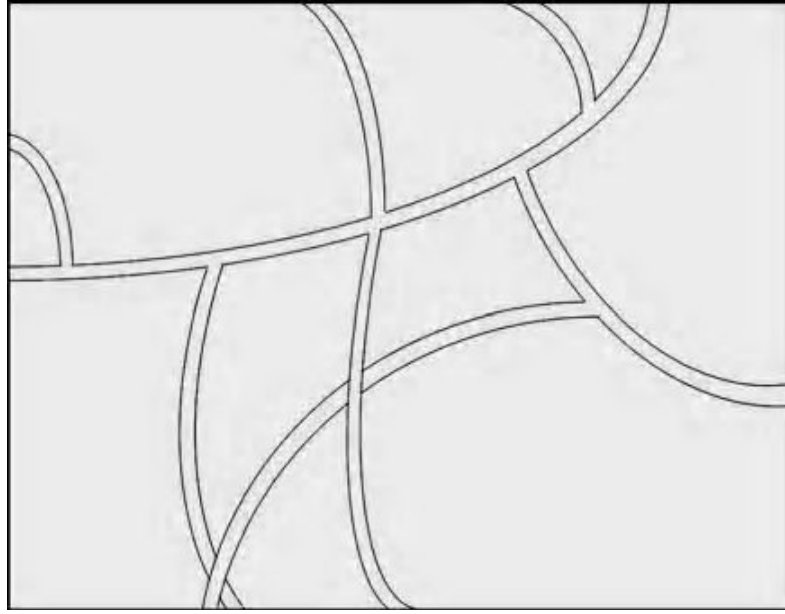
Diğer taraftan, PZF’de santifüj işlemi esnasında polimerizasyon yavaş ve doğal olarak gerçekleşir. Sığır trombini kullanılmadığı için otolog fibrinojene etki eden trombin konsantrasyonu fizyolojik seviyededir.

Polimerizasyon safhası elde edilen fibrin matriksin mekanik ve biyolojik özelliklerini anlamlı olarak etkileyecektir. Jelleşme safhasında fibrin iğcikleri iki farklı biyokimyasal yapıda oluşabilir; kondanse tetramoleküler/bilateral bağlantılar ve bağlantılı trimoleküler/eşkenar bağlantılar. Bilateral bağlantılar yüksek trombin konsantrasyonuna bağlı olarak, fibrin polimerlerini kalınlaştırıp sitokin salınımı ve hücre göçünü zorlaştırırlar (215).



Şekil 2.4. Bilateral bağlantılar (215).

Aksine, düşük trombin konsantrasyonları anlamlı oranda eşkenar bağlantı kurulmasını sağlar. Bu birbiri ile ilişkili bağlantılar sitokin salımına ve hücre göçünü kolaylaştıran ince, esnek fibrin ağı oluşumuna neden olur. Bu üç boyutlu organizasyon fibrin matrikse elastisite kazandırır.

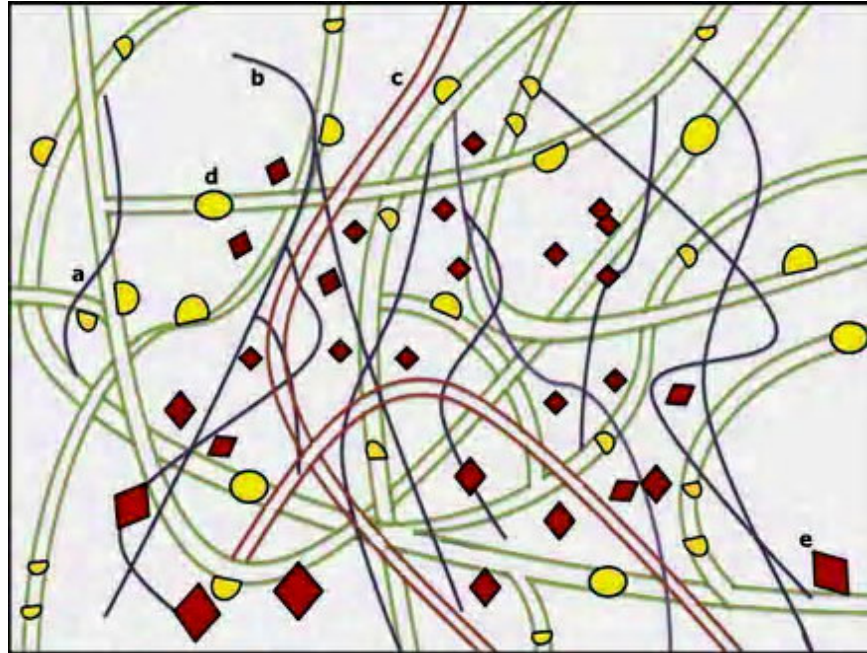


Şekil 2.4. Equilateral bağlantılar (215).

Konsantre PZP ve fibrin yapıştırıcılardaki şiddetli polimerizasyon safha fibrin matriks ile sitokinlerin yakın temasa geçerek etkileşimlerine izin vermez. Bu yüzden salınan sitokinler ekstrensek olarak kalıp jelleşme safhasında fibrin ağı ve kolloidal süspansiyon arasında sıkışır. Fizyolojik eliminasyonları hızlı bir şekilde gerçekleşir ve sitokin/fibrin sinerjisinin büyük kısmı kaybedilir.

İlerleyici şekilde gerçekleşen polimerizasyon modunda ise fibrin ağla bağlantı kuran sitokin miktarında anlamlı artış sağlanır (intrensek sitokinler). Bu bağlantı konfigürasyonunda sitokinlerin etki süreleri uzar. Çünkü bu sitokinler sadece başlangıç sikatrisiyal matriks remodelasyon döneminde salınıp kullanılırlar (uzun dönem etki). Böylece sitokinler uygun ortamda muhafaza edilerek, hücreler sikatrisiyel matriks remodelasyon fazına geçtiğinde stimülasyon etkilerini gösterirler ve yaralı alanın rekonstrüksiyonunu başlatırlar.

PZF kompozisyonunun biyokimyasal analizi, sitokinlerin glikanik zincirlerinin ve yapısal glikoproteinlerin (fibronektin) yavaş polimerize olan fibrin ağ içerisinde yakın şekilde bağ kurduklarını göstermiştir (Şekil 2.5.). Bu biyokimyasal bileşenlerin iyileşme sürecindeki sinerjistik etkileri iyi bilinmektedir. Örneğin, fibronektin hücre proliferasyon ve migrasyonuna rehberlik ederek, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDBF)'nin stimule edici etkisini artırır.



Şekil 2.5. PZF'nin şematik görüntüsü: a İntrenisek sitokinler ve glikanik zincirlerle birleşmiş fibrin fibrilleri. b Glikanik zincirlerle ilişkili fibrin. c Dolaşımdaki glikoproteinler(fibronektin) d Fibrin fibriller içine ve arasına tutunmuş sitokinler. e solüsyon içindeki platelet sitokinleri (215).

Tüm bu karşılaştırmalı parametreler PZF'nin yeni bir tür fibrin içeren biyolojik adeziv olarak kullanılması yerine, iyileşmeyi uyarıcı bir biyomateryal olarak kullanılmasını önermektedirler (36, 216).

2.4.4. PZF içindeki platelet dağılımı, büyüme faktörleri ve sitokinler

Hematolojik çalışmalar, plateletlerin fibrin pıhtısının alt kısımlarında biriktiğini, esas olarak da kırmızı korpusküller (kırmızı trombüs) ve PZF pıhtı arasındaki bağlantı bölgesinde yoğunlaştığını göstermiştir. Bu gözlem PZF'nin kırmızı sınıra yakın olan kısmının klinik kullanıma daha uygun ve hatta fibrin pıhtısının en üst katmanlarına göre daha etkili olduğu şeklinde yorumlanabilir.

2.4.4.1. Transforme edici büyüme faktörü β -1 (TGF β -1)

TGF β -1, TGF β 'nin esas olarak üretilen izoformudur. Tüm sitokinler arasında en güçlü fibrozis ajanıdır (216).

Hücrelerden kollajen ve fibronektin üretimini stimüle etmenin yanında fibroblast kemotaksisini de artırır. Kollajen yıkımını proteazları azaltarak ve proteaz inhibitörlerini

arttırarak baskılar, fibrojenezi artırır (217). TGF β -1 osteoblast prekürsörlerinin kemotaksis ve mitogenezisini sağlarken, aynı zamanda osteoblast birikimini de stimüle eder. Ek olarak, osteoklast oluşumunu ve kemik yıkımını inhibe ederek kemik oluşumunu artırır (218).

2.4.4.2. Platelet kaynaklı (türevi) büyüme faktörleri (PDBF)

PDBF'nin yara sahasında bulunan ilk büyüme faktörü olduğu ve bağ dokusu iyileşmesini, kemik rejenerasyon ve tamir sürecini başlattığı belirtilmektedir (218). PDBF'ler mezenşimal hücre dizilerinin migrasyon, proliferasyon ve canlılığının sağlanmasında önemli düzenleyicilerdir (216). PDBF'nin önemli aktiviteleri arasında mitogenez(iyileşmekte olan hücrelerin sayısında artış.), angiogenezis(endotelial mitozla fonksiyonel kapillere dönüşüm) ve makrofaj aktivasyonu(yara sahasının debridmanı, tamir ve kemik rejenerasyonunun devamı için ikincil büyüme faktörü kaynağı) bulunmaktadır. Tek bir platelette 1200 molekül PDBF bulunur. Bu yüzden, PZF'de görülen yüksek platelet konsantrasyonuna bağlı olarak, yara iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda belirgin artış beklenmektedir (218).

2.4.4.3. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)

IGF 1 ve 2 birçok hücre türü için (tümör hücreleri de dahil) çoğalma ve farklılaşmada pozitif düzenleyici olarak rol oynarlar ve hücreleri apoptozisten korurlar (216).

2.4.4.4. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β yaygın izoformdur ve enflamasyon kontrolünde anahtar mediatördür.

Esas görevi yardımcı T lenfositlerini stimüle etmektir ancak TNF- α ile beraber IL-1, osteoliziste görev alır (219).

2.4.4.5. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6 çok fonksiyonlu bir sitokindir. Esas olarak B hücrelerinin final maturasyonunu yoluyla antikor üreten hücrelere dönüşümünü sağlayan, B hücre farklılaşma faktörüdür (220). B lenfosit popülasyonu içinde, IL-6 ile ankor salgılanması 120 - 400 kat artar (219).

Ek olarak, IL-6 T hücre aktivasyon ve proliferasyonu için esansiyel yan faktördür. IL-6'nın hematopoeze pozitif etkisi 1987 yılında Ikebuchi ve ark. tarafından tanımlanmıştır (221). IL-6 ve IL-3 sinerjistik etki göstererek in vitro hematopoetik kök hücre

proliferasyonunu sağlarlar. IL-6, aynı zamanda hepatosit hücrelerini stimüle edici faktör olarak görev yapar ve birçok akut faz geninin ekspresyonunu indükler (220).

IL-6 immün hücrelerine taşınan sinyallerin ana amplifikasyon basamağını oluşturur. Böylelikle enflamasyon, yıkım ve remodelasyon reaksiyonlarının zincir halkalarını destekler (219).

2.4.4.6. Tümör nekroze edici faktör α (TNF- α)

TNF- α bakteriyel endotoksinlerin başlattığı enflamatuvar yanıtta ilk salınan sitokinlerdendir. TNF- α monositleri aktive eder, fagositoz ve nötrofil sitotoksitesini artırır ve fibroblastların remodelasyon kapasitelerini stimüle eder. Ek olarak, IL-1 ve IL-6 gibi anahtar mediatörlerin ekspresyonunu düzenler (219).

2.4.4.7. İnterlökin 4 (IL-4)

IL-4 yardımcı T hücrelerinin Th2 hücrelerine dönüşümünü indükler (222) ve aktive B hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler. Enflamasyonu azaltarak iyileşmeyi hızlandırır (219). Bunu IL-1 reseptör antagonistini (IL-Ra) indükleyerek gerçekleştirir (223).

2.4.4.8. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

VEGF'nin anjiogeneze ilişkili süreçte ana düzenleyici molekül olduğu düşünülmektedir. IGF-1 ve IL1- β gibi faktörler VEGF'nin ekspresyonunu artırarak anjiogenezin düzenlenmesinde rol oynarlar (224). VEGF'nin proliferasyon, migrasyon, özelleşme veya sadece hayatta kalma gibi endotelyal hücre davranışları üzerinde direkt rolü vardır (219).

2.4.5. İyileşmeye etkileri

Hasarlı dokuların tamiri için yara iyileşme süreci gereklidir. Plateletler yara iyileşmesini gerçekleştiren polipeptid büyüme faktörlerinin zengin kaynağıdır (225). PZF biyolojisinde platelet ve lökosit sitokinleri önemli role sahip olsalar da, PZF'nin gerçek tedavi edici potansiyelini belirleyen platelet ve sitokinleri destekleyen fibrin matrikstir (38).

Anjiogeneze, immün kontrol, dolaşımdaki kök hücrelerin aktivasyonu ve epitelyal örtü ile yara yüzeyinin korunması, yara iyileşmesi ve yumuşak doku maturasyonunda önemlidir. Anjiogeneze; fibrin jelin üç boyutlu ağ yapısı içerisinde hapsolan sitokinlerin

kendiliğinden aktivite göstermeleri ve çözünebilir anjiogenez faktörlerinin varlığı ile açıklanabilir. Fibrin $\alpha\beta 3$ integrin ekspresyonunu stimüle ederek hücrelerin fibrin, fibronektin ve vitronektine bağlanmalarını sağlar. Bu safha anjiogenezde önemli bir basamaktır (226).

Fibrin ve fibrinojen bozunma ürünleri (FBÜ) yönlendirilmiş nötrofil migrasyonu için uyarıcı etki gösterirken, nötrofil yüzeyindeki CD11/CD18 ekspresyonunu da artırır. Bu kompleksler nötrofillerin kan damarı endoteline yapışmasını yönlendirir ve böylece transmigrasyon sağlanır. FBÜ tarafından gerçekleştirilen nötrofil aktivasyonu aynı zamanda nötrofil proteazlarının salımını da stimüle eder. Bu enzimler fibrin pıhtının çözünmesini sağladığı gibi kan damarlarının bazal membranları arasından hücre penetrasyonunu da sağlar. Yara sahasındaki nötrofiller kontaminasyona sebep olan bakteriyi toksik oksijen radikali üretimi ve enzimsel sindirim yolu ile yok eder (227). Monositler yara sahasına nötrofillerden daha sonra ulaşırlar. Yara sahasının makrofajlar tarafından kolonizasyonu, fibronektinin fibrine bağlı kimyasal ve fiziksel özellikleri ile ağ yapısı içerisinde hapsolmuş kemotaktik ajanlar tarafından kontrol edilir (226). Ayrıca, fibrinin monosit/makrofaj ile etkileşimi fagositozu integrin reseptör Mac-1(CD11b/CD18; CR3) üzerinden düzenler. D-dimer fibrin fragmanı proteazların salgılanmasını uyararak yara debridmanını sağlar. Böylece, makrofajlar yara iyileşme sürecinde fibrin tarafından yönlendirilen enflamatuar fazdan tamir fazına geçişte önemli rol oynarlar (227). Bu yolla fibrin, immüniteyi destekleyen doğal bileşeni oluşturur (226).

Başlangıç neovaskülarizasyonla yara sahasına taşınan dolaşımdaki kök hücreler fibrin pıhtı matriksi içinde hapsolur. Bu hücreler damar ve doku restorasyonunu sağlarlar. Fibrin matriks, epitelyal hücrelerin ve fibroblastların metabolizmalarını etkileyerek hasarlı dokuların örtülmesini sağlar. Yara kenarlarının çevresindeki epitelyal hücreler bazal ve apikal polaritelerini kaybederek, yara sahasına doğru bazal ve lateral uzantılar oluştururlar. Daha sonra hücreler fibrinojen, fibronektin, tenaskin ve vitronektin tarafından oluşturulan geçici matrikse göç ederler. Büyüme faktörleri, özellikle PDGF ve TGF β , pıhtı matriks proteinleri olan fibrin ve fibronektinle birlikte yara çevresi dokuda bulunan fibroblastları stimüle ederek proliferasyon, uygun integrin reseptör ekspresyonu ve yara sahasına göçü uyarırlar (227). Migrasyon ve fibrin bozunmasından sonra, fibroblastlar kollajen sentezine başlarlar (226).

2.4.6. PZF'nin Klinik Uygulamaları

Bu otolog biyomateryal kulak burun boğaz ve plastik cerrahinin yanı sıra diş hekimliğinde de yaygın kullanım alanına sahiptir.

PZF membranlar lateral sinüs yükseltme işleminde greft materyalleri ile kombine edilerek iyileşmeyi hızlandırmak için kullanılabilir. Choukroun ve ark. (228) lateral sinüs yükseltme işleminde, PZF ve dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (DKKA) uygulamasının kemik rejenerasyonunu hızlandırabileceğini belirtmişlerdir.

Kret ogmentasyonu işlemlerinde PZF membranlar greft materyallerinin stabilizasyon ve korunmasında kullanılabilir. Membranlar fibrin bandajları gibi etki göstererek yumuşak doku iyileşmesini hızlandırırlar ve büyük hacimde greft kullanıldığında dahi insizyon sahasının hızla kapanmasına yardımcı olurlar (38).

Maksiller rekonstrüksiyonda DKKA, PZF membran ve %0.5'lik metronidazol solüsyonu kombinasyonunun kullanıldığı bir çalışmada, keratinize doku kalınlığının arttığı ve protetik restorasyonların daha estetik sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Ek olarak PZF kullanımının operasyon sonrası ağrı, ödem ve enfeksiyöz olayları azaltabileceği vurgulanmıştır (38).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda (YKR) membran olarak PZF; yoğun matriks yapısı ile kemik greft materyalini ve operasyon sahasını stabilize eder ve korur. PZF fibrin membranın elastisitesi ve dayanıklılığı kolayca süturlanmasına olanak tanır (229).

Zhao ve ark. (230) radiküler kistlerin rejeneratif tedavisinde PZF ve biyoaktif camın birlikte kullanımının etkili bir tedavi modeli olduğunu belirtmişlerdir.

Simon ve ark. (231) çekim sahalarında PZF'yi tek başına greft olarak kullanmışlar ve hızlı klinik iyileşme, fleplerde minimal açılma ve mükemmel kemik yoğunluğu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, YKR prosedürleri ile karşılaştırıldığında, PZF'nin kısa cerrahi işlem süresi, iyileşme sırasında daha az rezorpsiyon ve uygulama kolaylığı gibi avantajlara sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada ise, implant yerleştirilmesi öncesi PZF uygulanan çekim soketlerinin klinik ve histolojik olarak incelenmiştir. İmplantların yerleştirilmesi esnasında olumsuz klinik duruma rastlanmamış ve histolojik incelemede yeni kemik oluşumu görülmüştür. Araştırmacılar PZF'nin implant bölgesinin hazırlanmasında alternatif olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (232). Küçük PZF diskleri çekim

defektlerine kolayca yerleştirilerek yara iyileşmesini hızlandırır ve ideal implant uygulamasına olanak tanır. PZF tıkaçları krestal kor elevasyon (KKE) işlemleri ve aynı seansta implantların yerleştirildiği sinüs tabanı yükseltme işlemlerinde kullanılabilir (38).

Mazor ve ark. (233) sinüs tabanı yükseltmesi işlemiyle aynı seansta gerçekleştirilen implant uygulamasında, tek başına kullanılan PZF'nin operasyon sonrası 6. ayda implantlar etrafında kemik rejenerasyonu sağlayabildiğini bildirmişlerdir.

Krestal yaklaşımla sinüs tabanı yükseltme işleminde, PZF greft materyali ile birlikte kullanılabileceği gibi, osteotom kullanımı esnasında sinüs membranını korumada ve membranın perfore olduğu durumlarda fibrin matriksin yara iyileşmesini artırıcı etkilerinden faydalanmak için de kullanılabilir. PZF membranlar lateral pencere tekniği ile gerçekleştirilen sinüs tabanı yükseltme işlemlerinde greftleme öncesi uygulanarak fark edilemeyen sinüs perforasyonlarının kapatılması ve/veya yeni perforasyonların önlenmesi amacıyla kullanılabilir (38).

Çalışmalarda PZF'nin periodontal defektlerin rejenerasyonu üzerine etkisi de araştırılmıştır. Chang ve ark. (232) PZF kullanılarak tedavi edilen periodontal kemik içi defektlerde radyografik olarak artmış kemik yoğunluğu ile birlikte cep derinliğinde azalma ve klinik ataşman seviyesinde kazanç saptamışlardır.

Pradeep ve Sharma (234) üç duvarlı kemik içi defektlerin tedavisinde flep operasyonu /PZF ve sadece flep operasyonunu karşılaştırdıkları çalışmalarında, PZF'nin sondalama derinliğinde daha fazla azalmaya, daha fazla klinik ataşman kazancı ve kemik dolumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların (235) bir başka çalışmalarında mandibular sınıf II furkasyon defektlerinin tedavisinde açık flep debridmanı ve PZF uygulanan bölgelerin sadece açık flep debridmanı uygulanan bölgelere göre anlamlı derecede daha iyi iyileşme gösterdiği belirtilmiştir. Pradeep ve ark.'nın (236) kronik periodontitis hastalarının kemik içi defektlerinin tedavisinde, PZF ve PZP kullanımını karşılaştırdıkları çalışmalarında iki platelet konsantrisi arasında klinik ve radyolojik olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

PZF membranlar dişeti çekilmelerinin tedavisinde farklı kök örtüm teknikleri ile beraber kullanılmışlardır. Anilkumar ve ark. (237) 2009'da PZF membranı tekli dişeti çekilme defektlerinin tedavisinde laterale konumlandırılmış flep tekniği ile uygulamışlardır. Operasyon sonrası 6. ayda yapılan kontrollerde tam kök örtümü,

mükemmel dişeti dokusu kontur ve rengi elde edilmiştir. Diğer taraftan Aroca ve ark. (238) PZF/ modifiye koronale konumlandırılmış flep tekniği kullanılan hastalarda, PZF kullanılmayan hastalara göre operasyon sonrası 6. ayda daha az kök örtümü gözlediklerini ancak PZF kullanılan hastalarda gingival/mukozal dokularda kalınlaşma(biyotip kalınlaşması) olduğunu belirtmişlerdir.

Saadoun (239) Miller sınıf 1-2 dişeti çekilme defektlerinin tedavisinde PZF/koronale konumlandırılmış flep tekniğinin invaziv olmayan bir metod olduğunu ve estetik kök örtümü sağladığını öne sürmüştür.

Jankovic ve ark. (240) 2012 yılında bilateral dişeti çekilmesine sahip olan bireylerde uyguladıkları BDG/KKF ve PRF/KKF'in benzer kök örtümü ile sonuçlandığını ancak keratinize dişeti genişliği artışında BDG'nin anlamlı düzeyde daha başarılı sonuçlar verdiği ifade edilmiştir.

Eren ve Atilla'nın aynı yıl içerisinde yaptıkları benzer bir çalışmada ise PRF ve bağ dokusu uygulanan bölgeler arasında kök örtümü miktarı, biyotip kalınlaşması ve keratinize doku artışı açısından fark gözlenmediği ancak KPF/PRF tekniğinin donör saha komplikasyonlarını elimine etmesi açısından daha uygun bir metod olduğu vurgulanmıştır (241).

2.4.7. İn vitro çalışmalar

PZF çok miktarda platelet ve lökosit sitokini içeren otolog bir fibrin matriksidir. Fibrin ağ içerisinde hapsolan sitokinler, 7-11 gün boyunca, fibrin çözündükçe, sürekli olarak salınımlarını sağlar. PZF membran fibrin bandaj gibi davranarak, yara kenarlarının iyileşmesini hızlandırır. Cerrahi sahanın operasyon sonrası korunmasını sağlayan PZF membran aynı zamanda greftlenmiş biyomateryalin integrasyonu ve remodelasyonunu da hızlandırır (38). Su ve ark. (242) çalışmalarında PZF membranlardan PDGF, TGF- β 1 ve VEGF salındığını ve membrandan artan eksudanın da büyüme faktörü içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar PZF membranın iyileşmeyi olumlu yönde etkilediğini ve kalan eksudanın ise greft partiküllerini ıslatmak için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

PZF'nin insan kemik mezenşimal kök hücreleri üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir in-vitro çalışmada (243), hücre sayısının 2 PZF'nin bulunduğu kültürlerde, tek PZF'nin bulunduğu kültürlerle, tek PZF'nin bulunduğu kültürlerin ise PZF'nin bulunmadığı kültürlerle oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. Osteoblast farklılaşması için de benzer

sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar PZF'nin in vitro insan kemik mezenşimal kök hücre proliferasyonunda doza bağımlı artırıcı etki yaptığını göstermektedir. Benzer şekilde bir başka çalışmada (244) PZF'nin insan dişeti fibroblastlarının, dermal prekeratinositlerin, preadipositlerin, ve maxillofasiyal bölgeden izole edilen osteoblastların primer kültürlerinde proliferasyonu artırıcı etkisi olduğu, ancak doza bağlı etkinin osteoblastlarda tüm deney süresince devam etmesine rağmen, fibroblastlarda sadece 14. günde anlamlı bir fark oluşturduğu gözlenmiştir. Gassling ve ark. (39) doku mühendisliği uygulamaları için PZF membranların kollajen membranlara göre insan periosteal hücrelerinin proliferasyonu için daha üstün bir biyomateryal olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında (40) PZF ve kollajen membranları ile PZF jelin insan osteoblast hücrelerinin ekimi ve proliferasyonu için uygun birer doku iskelesi olduklarını belirtmiş ve hücre proliferasyonunun PZF membranlarda diğer iki biyomateryale oranla daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

He ve ark. (245) PZF'nin PZP'ye göre alkalen fosfataz (ALP) ekspresyonu ve mineralizasyonun indüksiyonu açısından daha üstün bulmuşlardır. PZF'nin otolog büyüme faktörlerini yavaş yavaş salıdığını ve in vitro ortamda sıçan osteoblastlarının çoğalması ve farklılaşmasında PZF'nin PZP'ye göre daha kuvvetli ve uzun süreli etki oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Yakın dönem çalışmalar PZF'nin rejenerasyona yardımcı rolünün önemine işaret etmektedir. Tsai ve ark. (246) PZF'nin insan dişeti fibroblastları, periodontal ligament hücreleri, oral epitelyal hücreler ve osteoblastlar üzerine etkisini in- vitro olarak araştırmışlardır. PZF'nin osteoblastların, periodontal ligament hücrelerinin ve dişeti fibroblastlarının hücre proliferasyonunu stimüle ettiğini saptayan araştırmacılar bu durumun periodontal rejenerasyon için faydalı olabileceğini belirtmişlerdir. Wu ve ark.'da (247) PZF'nin osteoblast ataşmanı ve proliferasyonunu ve kemik rejenerasyonunu sağlayabilecek kolljen-ilışkili protein üretimini kendiliğinden arttırabileceğini belirtmişlerdir.

Kang ve ark.'larının (248) bulguları PZF'nin biyo-iskelet işlevi ve doku rejenerasyonu için büyüme faktörü rezervuarı olduğunu kuvvetle destekler. Araştırmacılar PZF ekstresinin insan alveoler kemik iliği kök hücrelerinin çoğalma, migrasyon ve seçici farklılaşmalarını artırdığını ve fare kalvariasında hazırlanmış kritik boyutlu defektlerin rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Chang ve ark.'nın (249)

çalışmasında ise PZF aktivasyonunun fosforile ekstrasellüler sinyalle düzenlenen protein kinaz (f-EDK) ve osteoprotegerin (OPG) ekspresyonunu başlattığı, bunun da kemik rejenerasyonu için faydalı olduğu belirtilmiştir. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada ise PZF'ye bağlı olarak f-EDK, OPG ve alkalen fosfataz (ALP) ekspresyonunda meydana gelen artışın periodontal rejenerasyona katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (250).

PZF immüitenin düzenlenmesinde de rol oynar. PZF'nin enfeksiyöz ajanlara karşı sahip olduğu anlamlı defans kapasitesi sitokinlerin kemotaktik özelliklerinin yanı sıra, neovaskülarizasyonla yara sahasına giriş sağlayabilme özelliklerinden ileri gelir. Muhtemeldir ki PZF ile tedavi edilen cerrahi bölgelerde görülen anlamlı enflamatuvar regülasyon fibrin ağ içersine hapsolmuş ve başlangıç matriksinin remodelasyonu sırasında salınan sitokinlerin (özellikle IL-4) geri besleme etkilerinin bir sonucudur (219).

İlk yayınlanan çalışmalar ve klinik tecrübeler PZF'nin erken yara iyileşmesi, kemik greftlerinin maturasyonu ve periodontal/peri-implant yumuşak dokuların estetiğini iyileştirdiği yönündedir (38). Ancak, sonraki çalışmalar bu biyomateryalin platelet ve enflamatuvar özelliklerini incelemeyi hedeflemektedir.

3. GEREÇ- YÖNTEM

Çalışmaya tedavi olmak için Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine başvurmuş, çekim endikasyonu konmuş olan üst çenede 3. molar dişe sahip, yaşları 25-31 arasında değişen (yaş ortalaması: 28.1), 18 (Kadın:5, Erkek:13) birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Çekim endikasyonu konmuş 3. molar dişler bölgesi dahil olmak üzere periodontal açıdan sağlıklı olmak
2. Sigara kullanmamak
3. Herhangi bir sistemik hastalığı ve sürekli ilaç kullanım zorunluluğu bulunmamak.

Çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve hastalara operasyon öncesi bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılmıştır.

3.1. DİŞETİ FİBROBLAST KÜLTÜRÜ

3.1.1. Hücre kültüründe kullanılan medyumların içeriği

3.1.1.1. Taşıma medyum

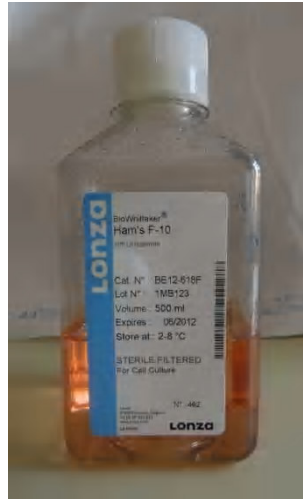
- 500 ml HAM's F-10 (Lonza Ham's F10 cat no:BE12-618F)
- 0,5 ml heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. İstanbul)
- 5 ml penisilin-streptomisin (Gibco Pen Strep 15240)

3.1.1.2.Ön Hazırlık Medyumu (CCM)

- 50 ml RPMI 1640 (Biological Industries, katalog numarası: 01-106-1B; İsrail)
- 50 ml HAM's F-10 (Lonza Ham's F10 cat no:BE12-618F)
- 1 ml penisilin-streptomisin (Gibco Pen Strep 15240)

3.1.1.3. Doku Kültür Medyumu

- 90 ml BIO-AMF-1 Bazal Medium (Biological Industries, Katalog numarası: 01-190-1B; İsrail)
- 10 ml BIO-AMF-1 Supplement (Biological Industries, katalog numarası: 01-192-1D; İsrail)
- 1 ml penisilin-streptomisin (Gibco Pen Strep 15240)
- 2 ml L-Glutamin (Biological Industries, katalog numarası: 03-020-1C; İsrail)
- 1 ml Heparin “(Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. İstanbul)



Resim 3.1. Ham's F10.



Resim 3.2. Penisilin-Streptomisin.



Resim 3.3. Tripsin-EDTA.



Resim 3.4. Kollajenaz.



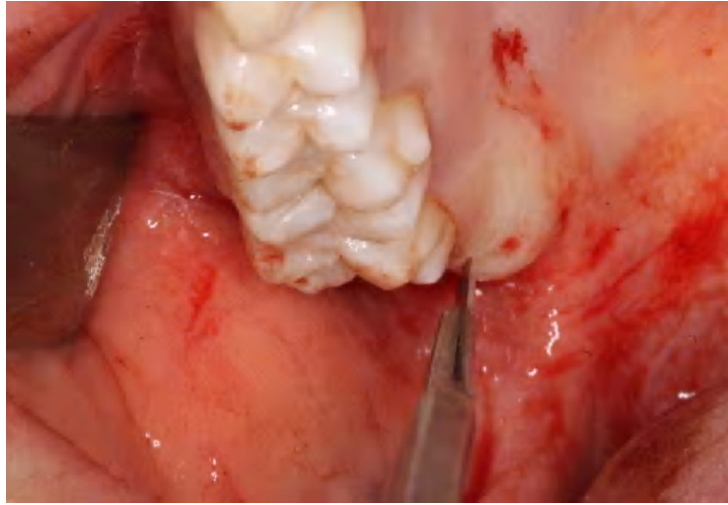
Resim 3.5. RPMI 1640.



Resim 3.6. Bio-Amf-1 Bazal Medyum ve supplement.

3.1.2. Hücre kültürünün hazırlanması ve takibi

1. Hastaların üst 20 yaş diş çekim soketi komşuluğundaki keratinize dişeti alanından 2x2 mm büyüklüğündeki dişeti dokusu 15 numaralı bistüri ucu yardımıyla uzaklaştırıldı.



Resim 3.7. Dişeti biyopsi örneğinin alımı.

2. Alınan dişeti örnekleri içinde taşıma medyumunun bulunduğu + 4°C’de saklanan, 12 ml’lik steril kültür tüpleri(Cellstar, Greiner Bio-One, Katalog no:164160; Almanya) içerisine konularak, bekletilmeksizin Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarına taşındı. Laboratuvar işlemlerinin hepsi laminar airflow steril (Class 2) (Herasafe class 2 kabin-HS09-2) kabin içinde gerçekleştirildi.

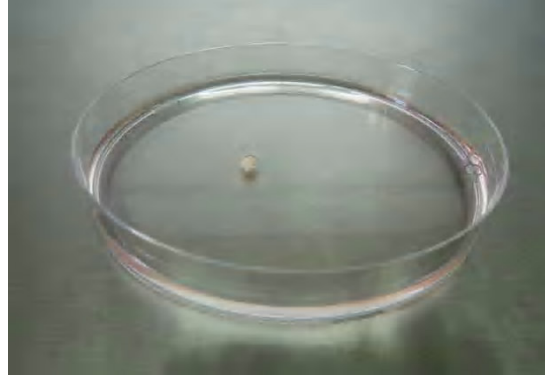


Resim 3.8. Çalışmada kullanılan steril hücre kültür tüpleri.

3. Steril petri dish içerisine alınan dişeti örnekleri 1 gece 37°C’de CO₂-li inkübatörde bekletildi.



Resim 3.9. Laminar airflow steril kabin.



Resim 3.10. Petri içine alınan biyopsi materyali.



Resim 3.11. CO²'li inkübatör.

4. İkinci gün örneklerin herbiri steril petri kabı içerisinde bistüri yadımı ile makroskopik olarak parçalandı.

5. Elde edilen heterojen karışım steril kültür tüpü içine alınarak 1400 devirde 5 dk santrifüj edildi.



Resim 3.12. Makroskobik parçalama .



Resim 3.13. Jouan B4 i Santrifüj cihazı.

6. Süpernatant (santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan düşük yoğunluklu sıvı) atılıp pellet (santrifüj sonrası tüpün alt kısmında kalan yüksek yoğunluklu tabaka) resüspanse edildi.

7. Süspansiyona 2 ml Trypsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C'de 1 saat kuru hava inkübatöründe (Nüve FN500) bekletildi.

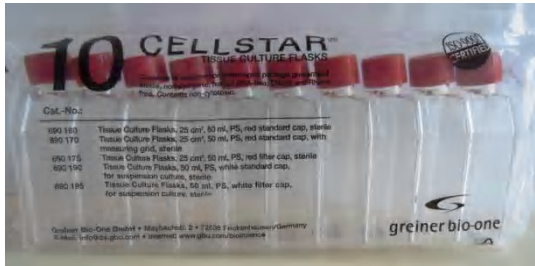
8. 1400 devirde 5 dk santrifüjü takiben süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi.

9. Süspansiyona 1 ml CCM ve 1 ml kollajenaz eklendi (CCM = 50 ml RPMI 1640 + 50 ml Ham's F10 + 1ml pen-strep). 37°C'de 2 saat bekletildi.



Resim 3.14. Kuru hava etüvü.

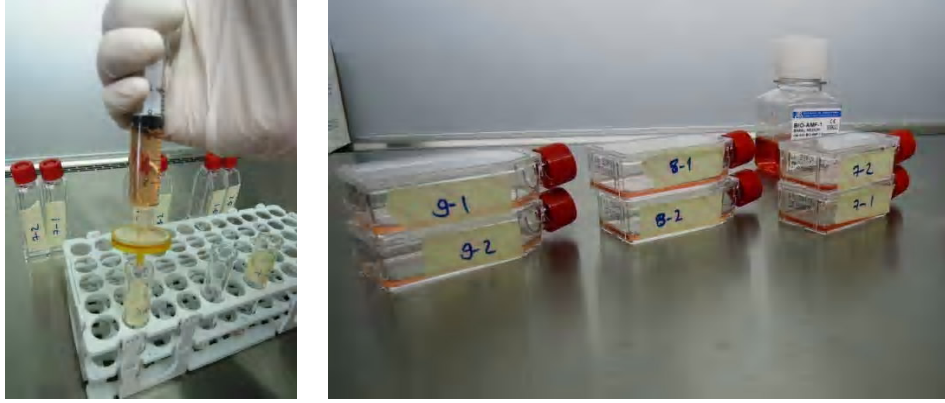
10. 1400 devirde 5 dk santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi.
11. Ortamdaki kollajenazı uzaklaştırmak amacıyla 3 ml CCM eklendi.
12. 1400 devirde 5 dk santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi.
13. Pellet üzerine steril şırınga filtreleri (Corning, part no: 431220) kullanılarak 9 ml Bioamf-1 bazal medium eklenerek iki farklı flaska (hücre kültürü flaskı) (Cellstar, Greiner Bio-One, katalog no:690160; Almanya) ekim yapıldı. Flask büyüklüğü 25cm², 50 ml olarak belirlendi. Flasklar inverted mikroskopta incelenip hücreler görüldükten sonra, 37⁰ C' de CO², li etüve yerleştirildi.



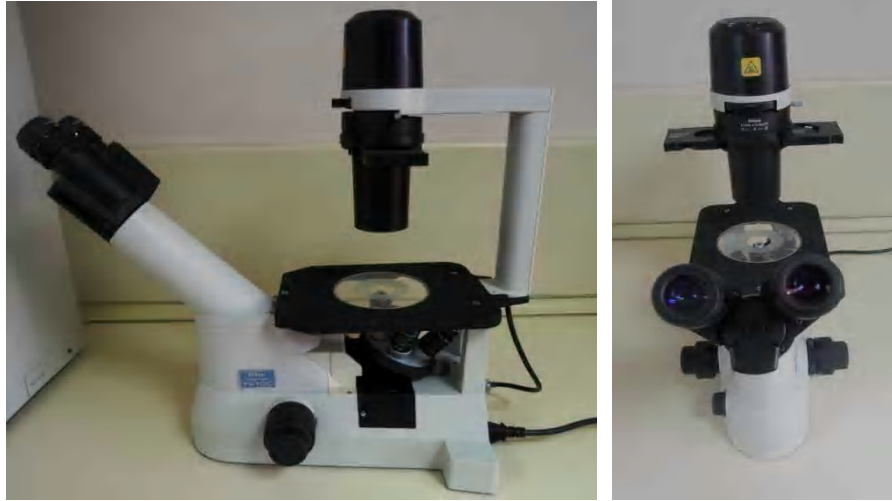
Resim 3.15. Hücre kültürü flaskları.



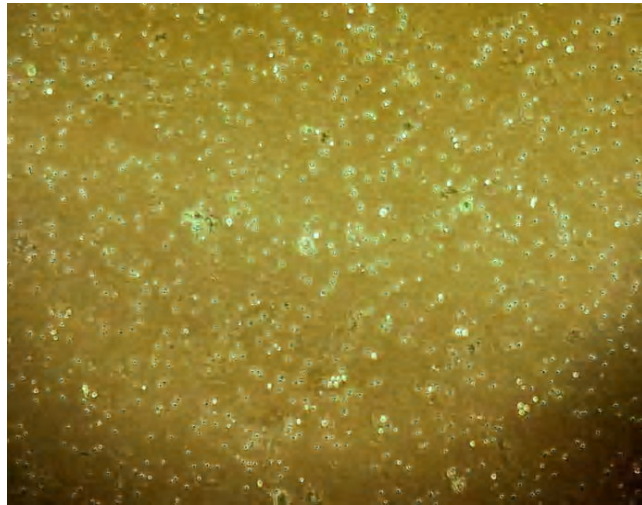
Resim 3.16. Steril şırınga filtresi.



Resim 3.17. Hücre süspansiyonlarına medyum eklenmesi ve flasklara ekim.



Resim 3.18. İnverted mikroskop (NİKON eclipse TS100).



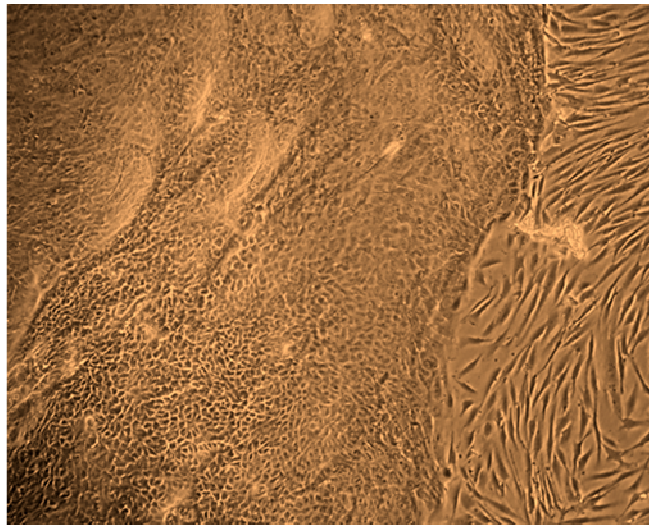
Resim 3.19. Yeni kültürü yapılmış(flaska tutunmamış) fibroblastların inverted mikroskop görüntüsü.

14. Ortalama 8. günün sonunda flasklar fibroblast tutunması açısından kontrol edildikten sonra, %80 hücre yoğunluğuna (konflense) ulaşıncaya kadar 1'er gün ara ile haftada 3 gün 4,5 ml medyum ile besleme yapıldı. Tüm flasklarda ortalama 15 gün sonunda %80 hücre yoğunluğuna ulaşıldı. Birinci hafta sonunda proliferasyon hızı yavaş olan 2 örnekte üreme hızını artırmak için bu flasklar içine bireylerin kendi kanından elde edilen PZF membranlar yerleştirildi.

15. Flasklar inverted mikroskopta incelendi. Saf fibroblast üremesi gözlenen kültürler çalışmaya dahil edilirken; farklı hücrelerin de ürediği 1 flask çalışma dışı bırakıldı.



Resim 3.20. Ortalama 15 gün sonunda %80 konflenseye ulaşmış fibroblastların inverted mikroskop görüntüsü.



Resim 3.21. Farklı hücrelerin ürediği ve çalışma dışı bırakılan tek flaskın inverted mikroskop görüntüsü.

16. Kültürün sonlandırılması ve tutunmuş fibroblastların kaldırılması için flask içerisindeki medyum 10 ml'lik enjektöre çekilerek, flask içine 37°C'de önceden ısıtılmış 2 ml Tripsin-EDTA solusyonu ilave edildi. Tripsin-EDTA solusyonu 5-10 sn sonra enjektöre çekildi ve tekrar 2 ml Tripsin-EDTA ilavesini takiben 4 dk 37°C'de kuru inkübatörde bekletildi.

17. Hücrelerin kalktığı inverted mikroskopta gözlendikten sonra, enjektör içindeki medyum tripsin aktivitesini durdurmak üzere tekrar flaska eklendi. Flask içindeki hücre süspansiyonu steril pastör pipeti ile steril kültür tüpüne alındı ve 800 devirde 10 dk santrifüj edildi. Ardından 1ml hücre süspansiyonu elde edilecek şekilde medyum ile dilue edilerek içerisinden 10 µl alındı ve toma lamında hücre sayımı gerçekleştirildi. Mililitredeki hücre sayısı hesaplandı.

Formül= HS(toma lamında sayılan hücre sayısı) x DO(diluasyon oranı) x SS(sabit sayı)

Mililitredeki hücre sayısı= $450 \times 10^{-1} \times 10^4 = 4.5 \times 10^5$



Resim 3.22. Kültürün sonlandırılması.



Resim 3.23. Toma Lamı.

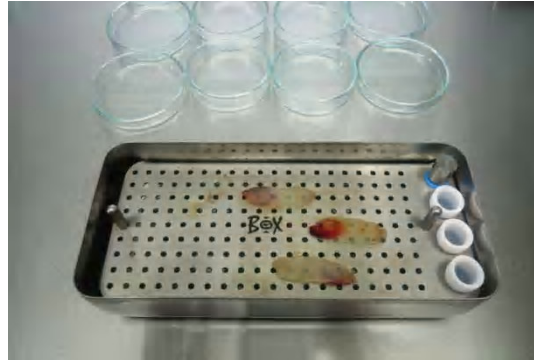
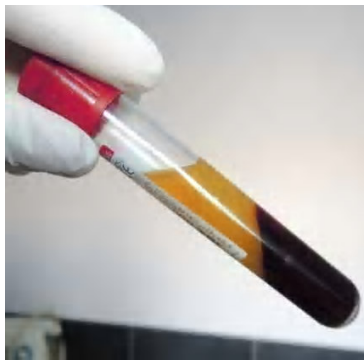
18. Hücrelerin flasklardan kalkmasına eş zamanlı olarak hastalardan 10 ml'lik cam kaplı plastik tüpler ile alınan kanlardan, PRF kutuları kullanılarak Choukroun'un PZF protokolü (antikoagülsiz tüplerde, 3000 devir x 10dk) (36) "doğrultusunda PZF membranlar hazırlandı.



Resim 3.24. 10 ml'lik antikoagölansız tüplerle kan alımı.



Resim 3.25. PZF yapımında kullanılan santrifüj cihazı (Hettich EBA 20, Almanya).

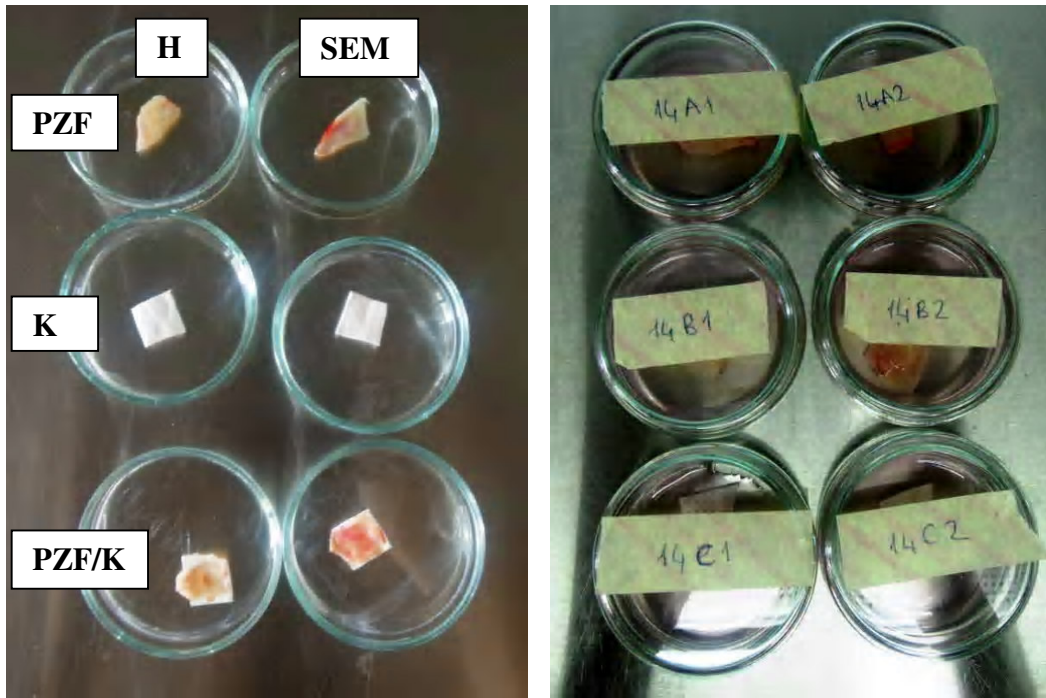


Resim 3.26. Tüpte jel halinde olan PZF'nin PZF kutusunda membran haline getirilmesi.

19. Kollajen membranlar dörde bölünerek dört ayrı steril petri kabı içine poröz yüzey flask tabanına bakacak şekilde yerleştirildi.

20. PZF membranlar ikiye bölünerek, iki parçası steril petri kabına, iki parçası da kollajen membranların düz yüzeyi üzerine gelecek şekilde yerleştirildi.

21. Çalışmaya katılan her bireye ait hücre süspansiyonu ile 2 PZF membran, 2 kollajen/PZF membran ve 2 kollajen membran olmak üzere 6 ekim yapıldı.



Resim 3.27. Üzerinde fibroblast kültürü gerçekleştirilen membran grupları.



Resim 3.28. Çalışmada kullanılan kollajen Membran (Bio-gide 25X25 mm).

22. Ekim örneklerinden üçü histolojik inceleme diğer üçü ise SEM incelemesi için hazırlandı.

23. Grupların herbiri kodlanıp sınıflandırıldı ve 1 hafta süre ile 37°C’de CO²’li inkübatörde bekletildi.

24. Günaşırı medyum değişimi yapılarak deney 7. günde sonlandırıldı.

3.2. Histolojik inceleme

Işık mikroskobu için hazırlanan eksplantlar 7. gün sonunda %10’luk formaldehit içinde fikse edildi. Tespit solüsyonunda 48 saat bekletilen eksplantlar bir gece boyunca akan musluk suyu altında tutulduktan sonra bekletildikten sonra konsantrasyonları artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı. Ardından ksilol ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Yapılan bu işlemler sırasıyla tablo 3.1.’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.1. Işık Mikroskobu İçin Doku Hazırlama Tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	1 gece	8	Absolü Alkol	1 saat
2	%50 Alkol	1 saat	9	%50 Ksilen-Alkol	10 dakika
3	%70 Alkol	1 saat	10	%70 Ksilen-Alkol	10 dakika
4	%80 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%96 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	Absolü Alkol	1 saat	13	Ksilen	20 dakika
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Eriyik parafin	1 gece
			15	Bloklama	

Parafin bloklardan Leica RM2155 mikrotom ile alınan 5µm’lik kesitler prolizin kaplı lamalara yayıldı. Histolojik inceleme için kesitler hematoxilen-eozin (H-E) (tablo3.2.) ve Masson’un üçlü boyası (Masson’s trichrome: M-T) (tablo 3.3.) ile boyandı.

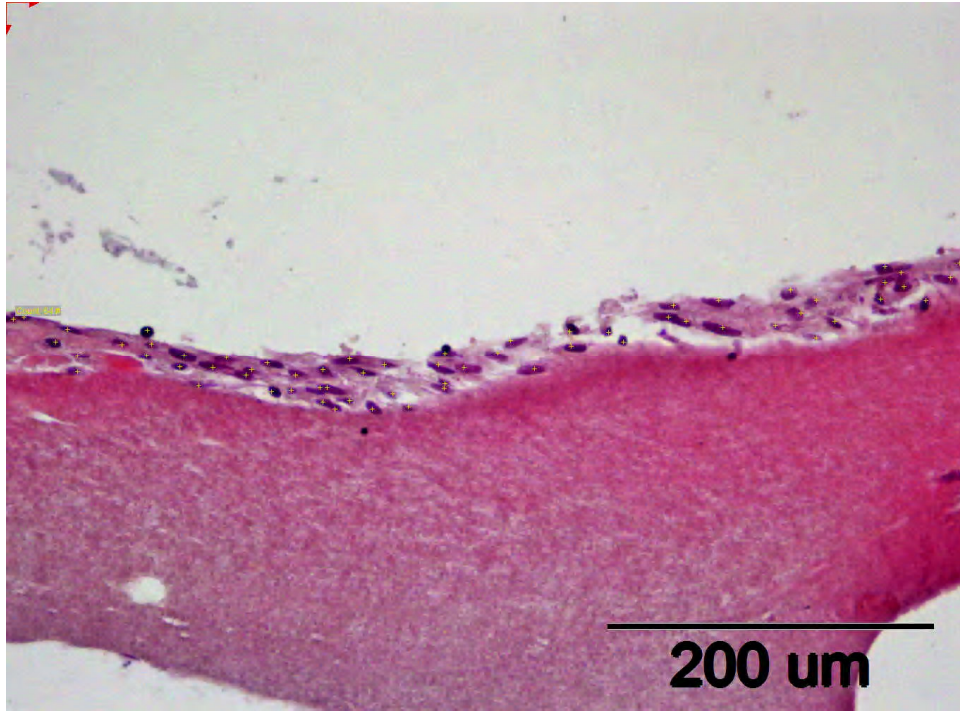
Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği.

	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv(60°C)	1 saat	13	Akansu	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	14	Eozin	3-5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	15	Akansu	5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	16	%50 Alkol	10 dakika
5	Absolü Alkol I	20 dakika	17	%70 Alkol	10 dakika
6	Absolü Alkol II	20 dakika	18	%80 Alkol	10 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	19	%96 Alkol	10 dakika
8	%80 Alkol	20 dakika	20	Absolü Alkol I	10 dakika
9	%70 Alkol	20 dakika	21	Absolü Alkol II	10 dakika
10	%50 Alkol	20 dakika	22	Ksilen I	20 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen II	20 dakika
12	Hematoksilen	5-8 dakika	24	Kapatma	

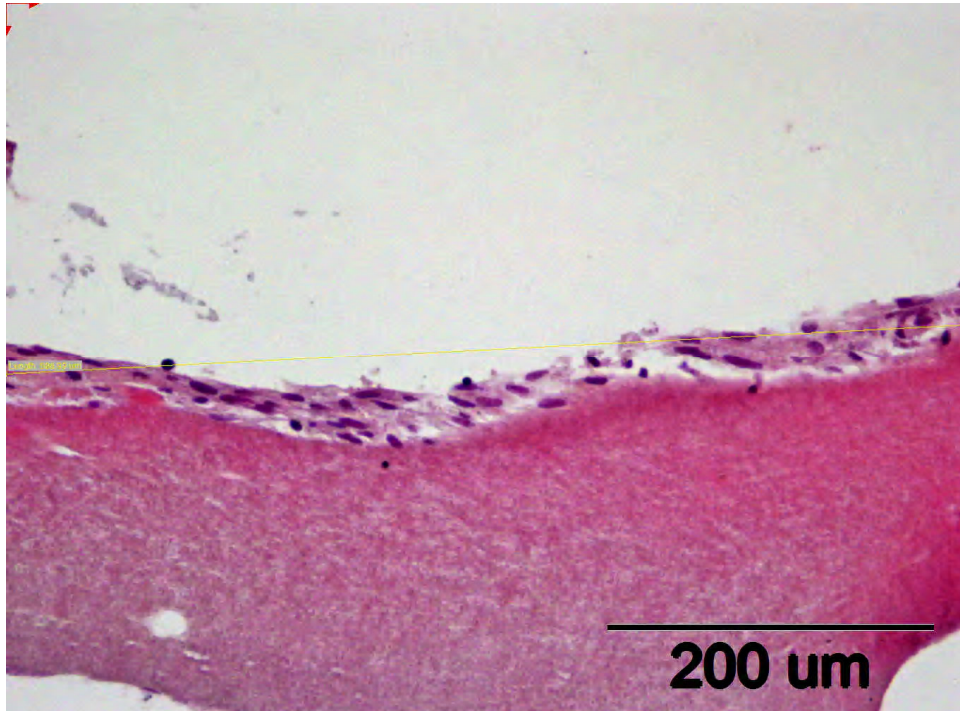
Tablo 3.3. Masson'un Üçlü Boyama Tekniği.

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv(60°C)	1 saat	16	Distile su	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	17	Fosfomolibdik asit	5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	18	Anilin blue solüsyonu	2-5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	19	Distile su	5 dakika
5	Absolü Alkol I	20 dakika	20	%1'lik asetik asit	2 dakika
6	Absolü Alkol II	20 dakika	21	Distile su	5 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	22	%50 Alkol	10 dakika
8	%70 Alkol	20 dakika	23	%70 Alkol	10 dakika
9	%50 Alkol	20 dakika	24	%96 Alkol	10 dakika
10	Akansu	5 dakika	25	Absolü Alkol I	10 dakika
11	Hematoksilen	5-8 dakika	26	Absolü Alkol II	10 dakika
12	Akansu	5 dakika	27	Ksilen I	20 dakika
13	Asit-Alkol	3-5 dakika	28	Ksilen II	20 dakika
14	Akansu	5 dakika	29	Kapatma	
15	Asit fuksin	5dakika			

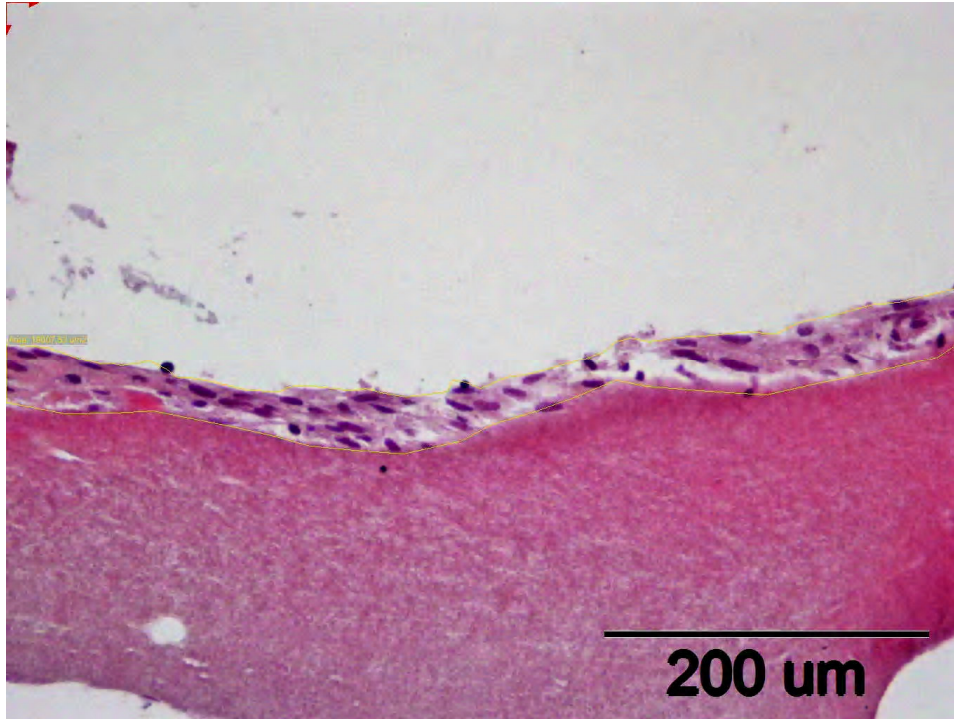
Boyanmış kesitler Olympus BX51 mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflar alındı. Çalışmaya katılan her bireye ait membran gruplarından elde edilen kesitlerden rastgele 5 (beş) alan seçildi. Aynı mikroskoptaki 'Analysis LS Research' programı kullanılarak membranlar üzerindeki fibroblast hücre çekirdeklerinin sayısı, fibroblastların kapladığı alan ve kesintisiz olarak devam eden fibroblast dizisinin uzunluğu hesaplandı (Resim 3.29).



Resim 3.29. Hematoksilen-Eozin ile boyama yapılmış bir PZF membran kesitinde fibroblast hücre çekirdeklerinin sayımı.



Resim 3.30. Hematoksilen-Eozin ile boyama yapılmış bir PZF membran kesitinde kesintisiz fibroblast dizisinin uzunluğunun ölçülmesi.



Resim 3.31. Hematoksilen-Eozin ile boyama yapılmış bir PZF membran kesitinde , sayılan fibroblastların kapladığı alan.

3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) incelemesi

Eş zamanlı olarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) için hazırlanan eksplantlar %2,5luk gluteraldehit içinde fikse edilerek, incelenmek üzere numaralandırılarak saklandı. Çalışma başlangıcında eksplantlar 0,1M fosfat tamponu (pH=7,4) içinde 4 defa 15'er dakika, distile su içinde 3 defa 5'er dakika yıkandı. Sonrasında %1'lik osmiumtetroksit (OsO_4) ile ikinci tespit işlemi gerçekleştirildi. Eksplantlar konsantrasyonu artan aseton serilerinde (%50.70.80.90.100.100.100) 15'er dakika dehidrate edildikten sonra, sıvı CO_2 içinde kritik nokta kurutucusunda (Polaron E300) kurutuldu.

Eksplantlar metal stublar üzerine yerleştirildikten sonra sputter coater'da (Polaron SC76) altın paladyum ile 45nm kalınlığında kaplandı ve LEO 440 SEM'de sekonder elektron(SE) modunda, 15kV'de incelendi. 2000 ve 5000 KX magnifikasyonlarda görüntüleme yapıldı.



Resim 3.32. Leica RM 2155 mikrotom.



Resim 3.33. Olympus BX51 mikroskop. **Resim 3.34.** Kritik nokta kurutucusu (Polaron E300).

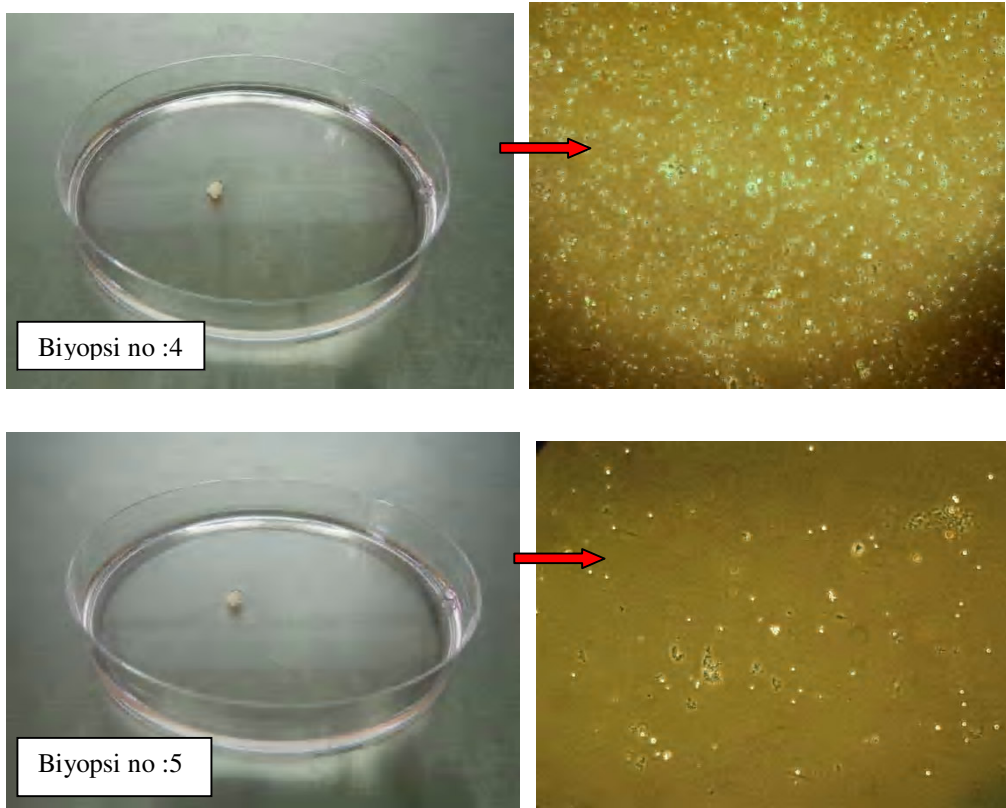


Resim 3.35. Sputter coater(Polaron SC76). **Resim 3.36.** Taramalı elektron mikroskobu (Leo440) .

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

Çalışmaya katılan bireylere ait dişeti biyopsi materyallerinden aynı kültür protokolleri uygulanarak primer fibroblast kültürleri elde edildi. İnverted mikroskop gözlemleri farklı bireylere ait, eşit büyüklüklerdeki dişeti biyopsi örneklerinden inkübasyon öncesinde farklı yoğunluklarda hücreler elde edildiğini ortaya koydu (Resim 4.1.).



Resim 4.1.Dişeti biyopsi materyalleri ve elde edilen hücrelerin inkübasyon öncesi inverted mikroskop görüntüleri.

İnverted mikroskop incelemesi sırasında bölünme eğilimli, flaska henüz tutunmamış fibroblast hücrelerinin yuvarlak şekilli ve parlak olduğu gözlenirken, yaklaşık bir hafta sonunda flaska yer yer tutunmaya başlayan fibroblastların içsi morfolojide olduğu saptandı.

Birinci hafta sonunda fibroblast üreme hızı yavaş olan ve 15 gün sonunda %80 konfluense ulaşılamayacağı öngörülen iki flaska, bireylerin kendi kanından elde edilen PZF membranlar ilave edildiğinde üreme hızının arttığı ve 15 gün sonunda hedef hücre konsantrasyonuna ulaşıldığı gözlemlendi. Böylelikle ortalama 15 günün sonunda tüm flasklarda %80 konfluense ulaşıldı (Resim 3.20.).

Flaskların biri dışında hepsinde sadece fibroblastların ürediği, tek flaskta fibroblastlara farklı hücrelerin de eşlik ettiği gözlemlendi ve bu flask çalışma dışı bırakıldı (Resim 3.21.).

Üzerinde fibroblast kültürü gerçekleştirilen kollajen membranların medyum içerisinde, bir haftalık süreç boyunca makroskopik olarak boyutsal stabilitelerini koruduğu ancak PZF membranların rezorbe olmaya başladığı gözlemlendi. Rezorbe olan membranlar üzerindeki fibroblastların yer yer flask yüzeyine tutunup çoğaldığı izlendi.

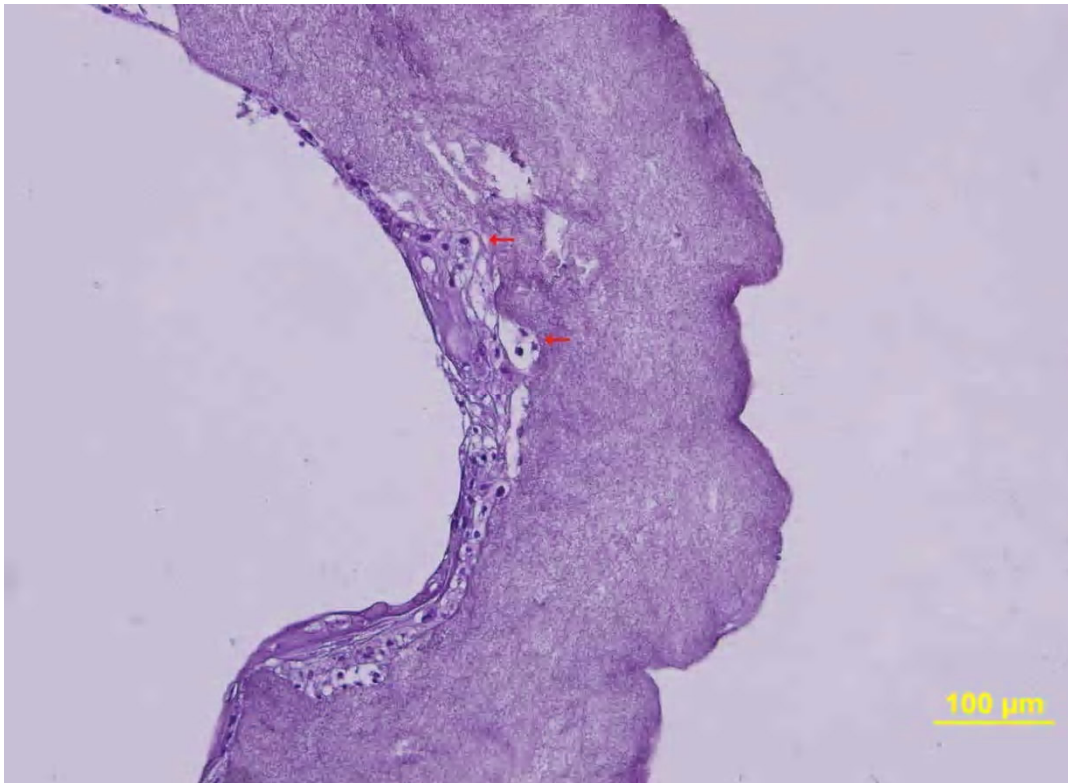
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

İn vitro ortamda PZF, PZF/kollajen ve kollajen membranlar üzerinde bir hafta kültürü yapılan fibroblastların tutunma ve proliferasyon özellikleri ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirildi. Yapılan histolojik inceleme sonucunda, tüm membran gruplarından elde edilen eksplantlara ait bulguların birbirine benzer olduğu görüldü:

- PZF, PZF/kollajen ve kollajen membran gruplarında bir haftalık fibroblast hücre kültürü sonunda bağ dokusu oluşumu,
- Hücre kültürü yöntemi ile çoğaltılıp farklı membranlar üzerine ekilen fibroblast hücrelerinin altındaki membran yapısına sıkıca tutunduğu,
- Tutunan fibroblast hücrelerinin yedi gün içinde kollajen sentezi yaparak, proliferasyon yapan yeni fibroblast hücreleri ile kollajen bağlantılar kurduğu,
- Her üç grupta da; membran yüzeyine komşu bölgede fibroblastlardan zengin, kollajenden zayıf, gevşek bağ dokusunun olduğu, membran yüzeylerinden uzaklaştıkça; fibroblastlar arası matriks sentezinin arttığı ve sıkı bağ dokusunun meydana geldiği izlendi.

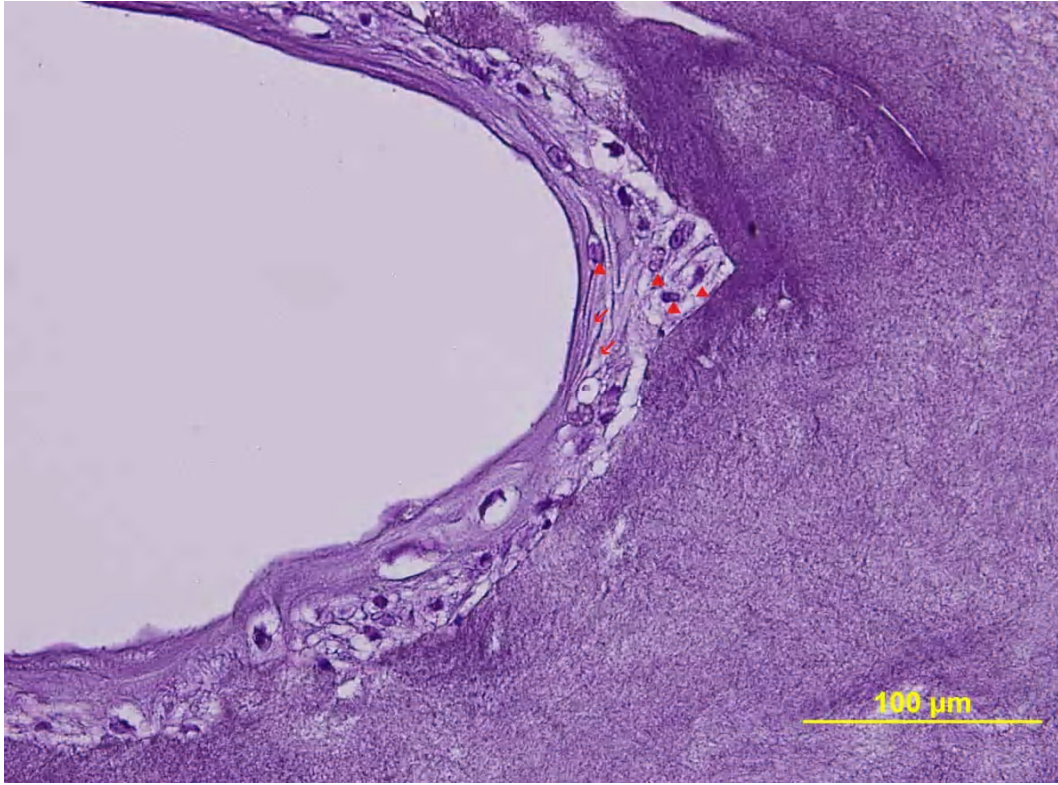
4.2.1. PZF Membran Grubuna Ait Bulgular

Nispeten sağlam görümlü (fibrin ağın çözünmeye başlamasıyla rezorpsiyon sürecine girmiş ancak bütünlüğünü kaybetmemiş olan) PZF üzerinde rezorpsiyon alanlarının olduğu ve bu alanlarda fibroblastların yoğun ara madde ve kollajen lif ürettiği gözlemlendi. Rezorpsiyon alanlarındaki fibroblast sayısının rezorpsiyonun olmadığı bölgelere oranla daha fazla olduğu saptandı (Resim 4.2.).



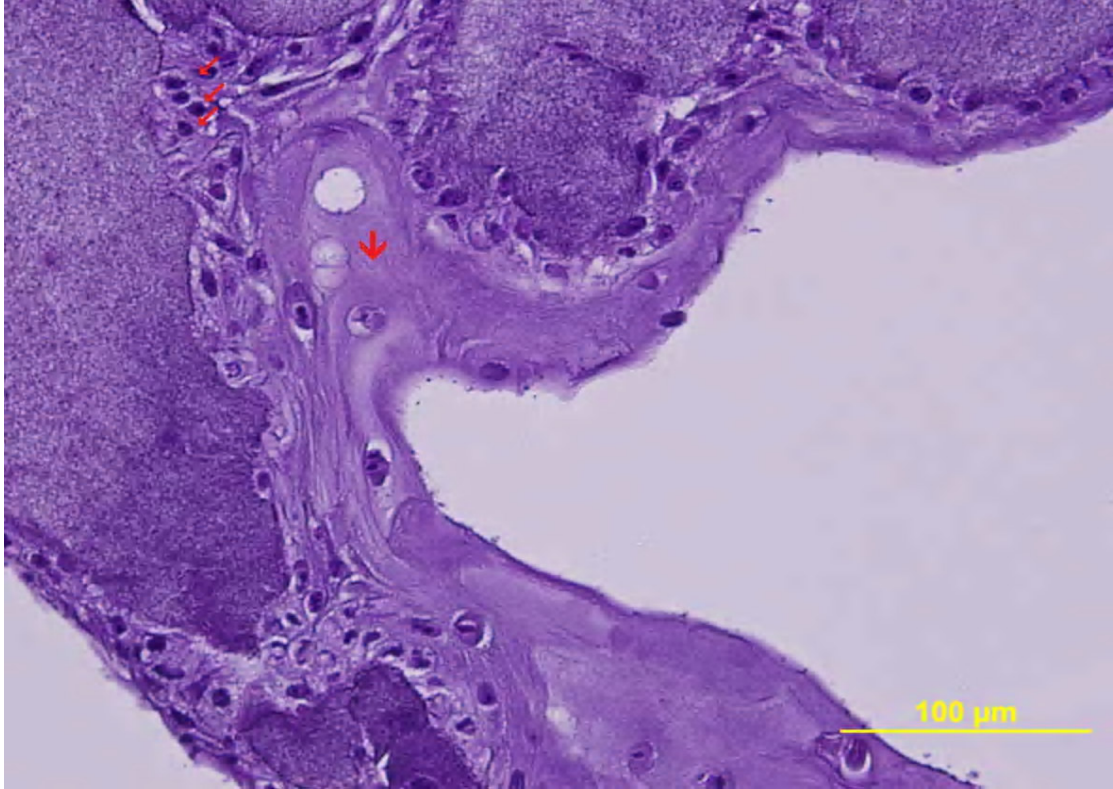
Resim 4.2. PZF üzerinde oluşan rezorpsiyon alanları(←). H-E boyama, X20.

PZF üzerindeki fibroblastların 3-4 tabakalı dizilim gösterdiği ve her bir tabakadaki fibroblastların ürettiği matriks yığınının PZF'ye paralel çizgilenmeler oluşturduğu belirlendi (Resim 4.3.).



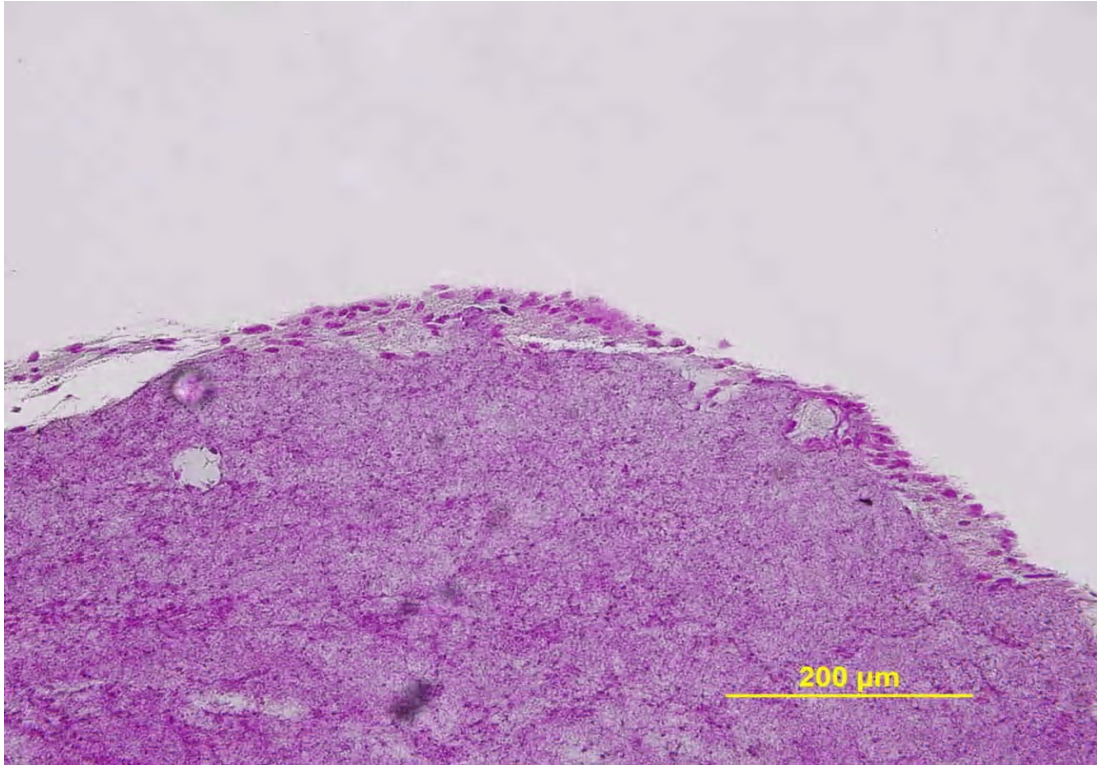
Resim 4.3. PZF üzerinde oluşan rezorpsiyon alanlarında 3-4 tabakalı dizilim gösteren fibroblastlar (▲) ve PZF'ye paralel matriks yığılması (↗). H-E boyama, X40.

PZF'nin daha fazla rezorbe olup derin çukurlar oluşturduğu bölgelerde, fibroblastların yığılım gösterdiği ve PZF'ye sıkıca tutunduğu gözlemlendi. Özellikle PZF yüzeyinde daha fazla sayıda fibroblast bulunurken, membran yüzeyinden uzaklaştıkça fibroblastlar arası mesafenin arttığı ve aralarının matriks ile dolduğu izlendi (Resim 4.4.).



Resim 4.4. PZF membran yüzeyine yakın fibroblastlar (✓), membran yüzeyinden uzaklaştıkça artan matriks yığılımı (↓). H-E boyama, X40.

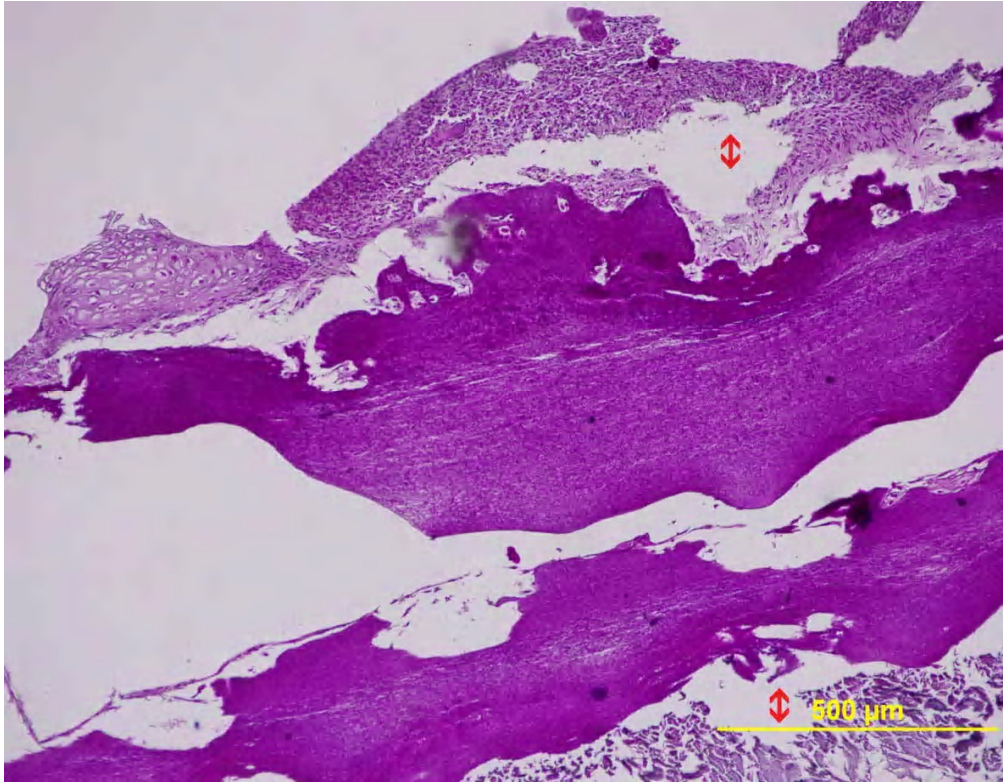
Çalışmaya katılan iki bireye ait eksplant kesitlerinde fibroblast proliferasyonunun fazla, matriks miktarının az olduğu ve yer yer kollajen kaynaklı çizgilenmeler olduğu gözlemlendi (Resim 4.5.).



Resim 4.5. PZF membran grubu. Fibroblast proliferasyonunun çok, kollajen üretiminin az olduğu eksplanta ait kesit M-T boyama, X120.

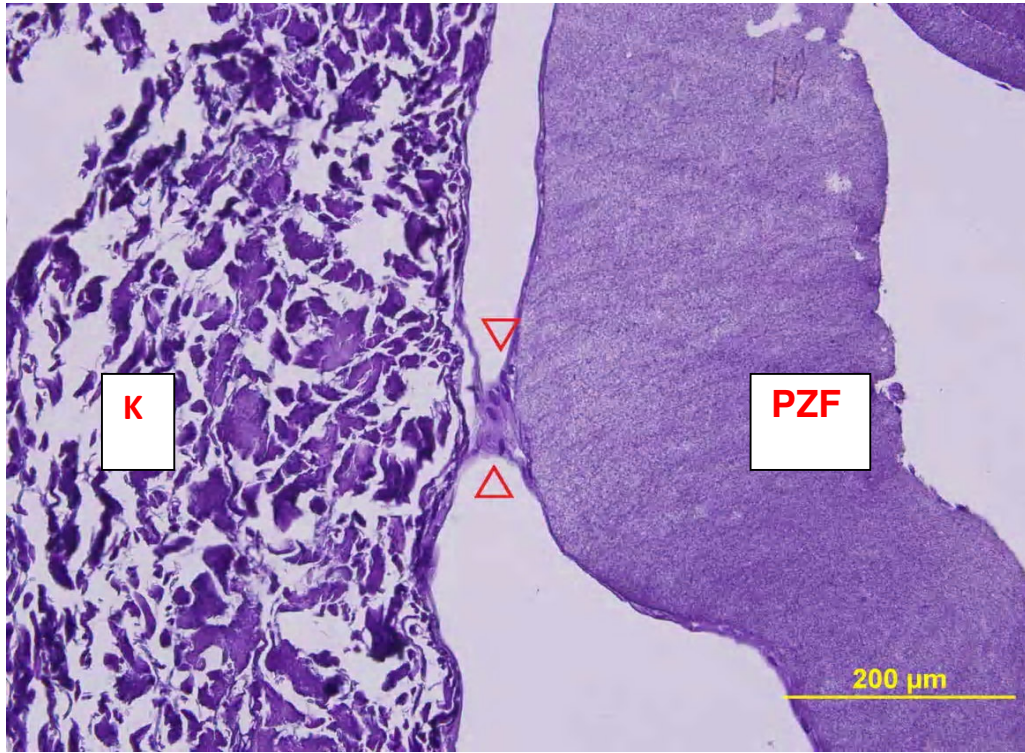
4.2.2. PZF/kollajen Membran Grubuna Ait Bulgular

Bu gruba ait tüm kesitlerde PZF'nin altındaki kollajen membrandan ayrıldığı ve PZF üzerine ekimi yapılan fibroblastların hem PZF hem de kollajen membran üzerine tutunduğu gözlemlendi. PZF ve kollajen membran üzerinde oluşan bağ dokusunda yer yer ayrılma ve açılmalar belirlendi (Resim 4.6.).



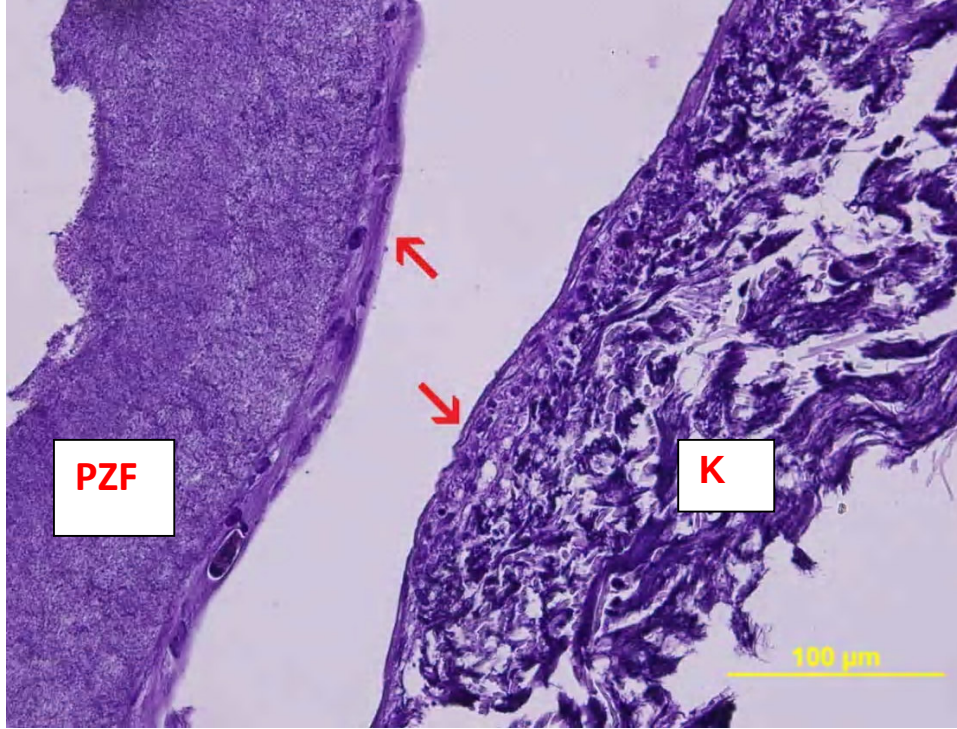
Resim 4.6. PZF/kollajen membran grubu. PZF –kollajen membran arası ve bağ dokusundaki ayrılmalar (↕). H-E boyama, X10

PZF ve kollajen membranın, görünüm ve yapısal özellikleri bakımından birbirinden belirgin bir şekilde farklı olduğu izlendi. Kesitlerde PZF'nin homojen bir yapı gösterdiği, kollajen membranın ise üç boyutlu lif dizilimleri sergilediği belirlendi. PZF ve kollajen membranlar arasında ayrılma gözlenen bölgelerde fibroblastların bu alanlara girerek çoğaldığı ve membranları birbirine bağladığı saptandı (Resim 4.7.).



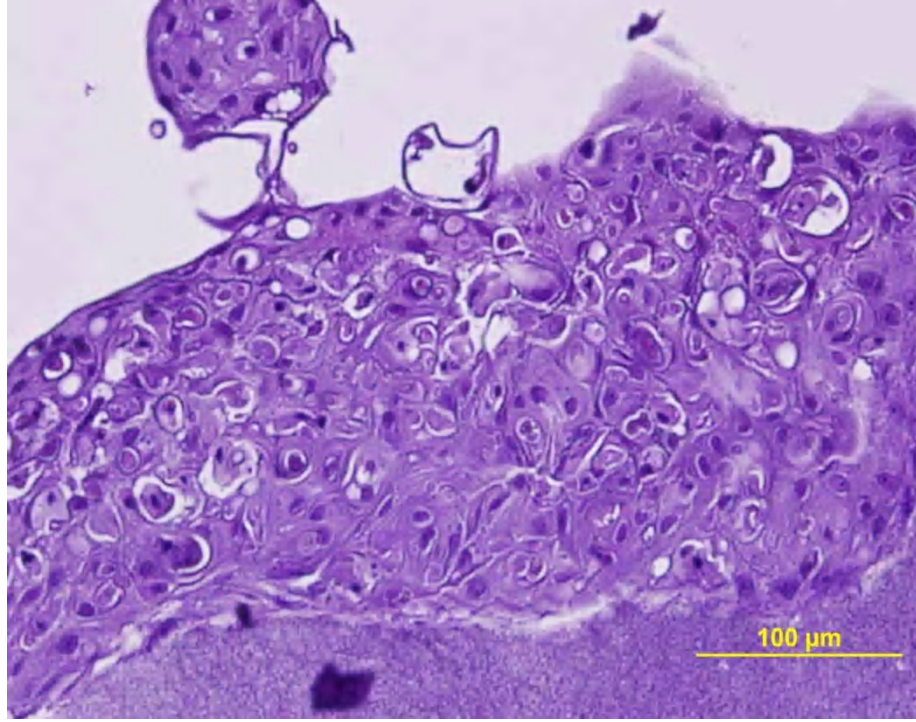
Resim 4.7. Kollajen ve PZF membranlar arasında fibroblastlardan meydana gelen bağlantı ($\triangle$, ∇). H-E boyama, X20.

PZF ve kollajen membranın birbirinden ayrıldığı yüzeylerde fibroblast tutunması ve proliferasyonu görüldü (Resim 4.8.).



Resim 4.8. PZF ve kollajen membran yüzeylerinde meydana gelen fibroblast proliferasyonu (↖, ↘). H-E boyanma, X40

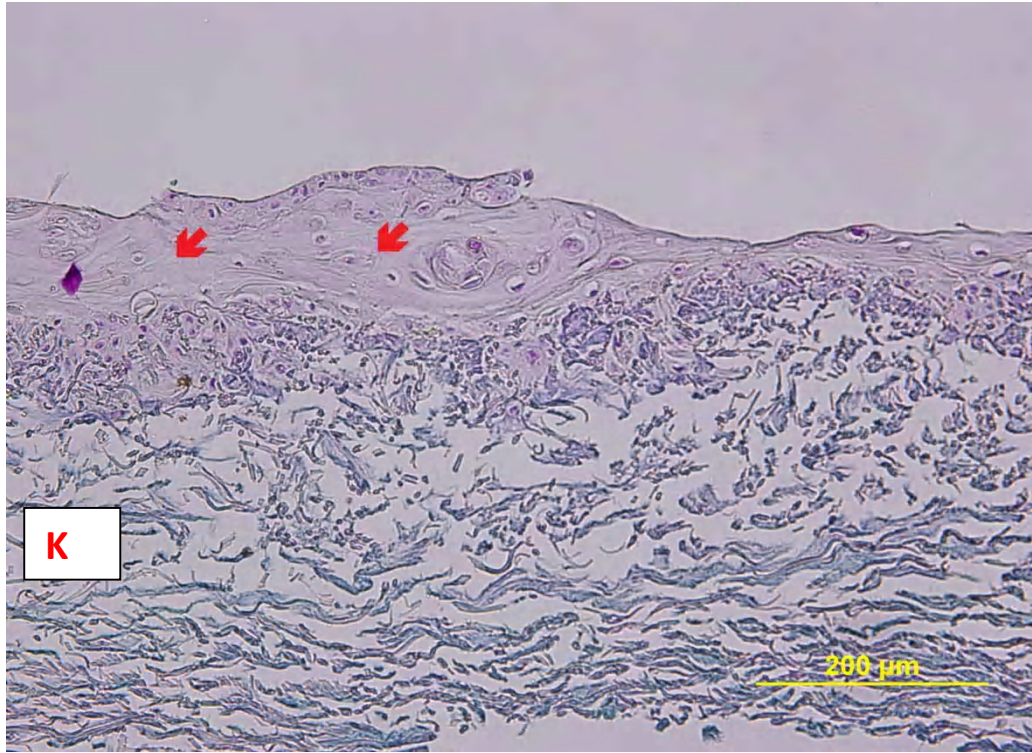
PZF üzerindeki rezorpsiyon alanlarının yüksek büyütmelerinde fibroblastların bu bölgelere göç ederek çoğaldığı belirlendi (Resim 4.9.).



Resim 4.9. PZF/kollajen membran . PZF üzerindeki yoğun fibroblast proliferasyon alanı.H-E boyama, X40.

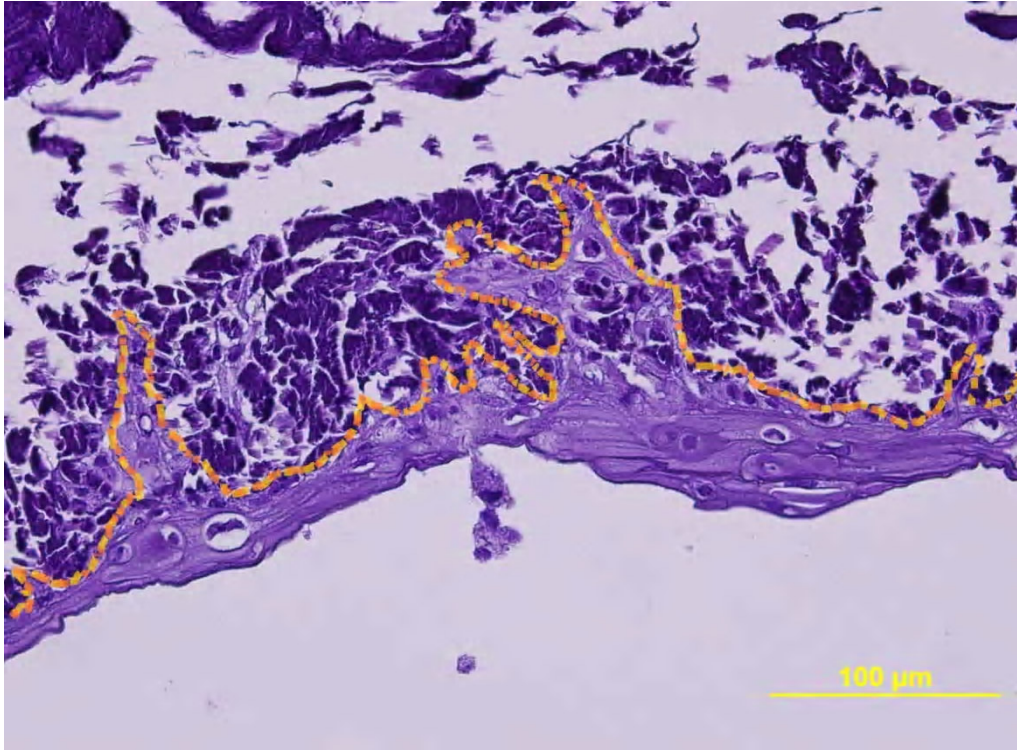
4.2.3. Kollajen Membran Grubuna Ait Bulgular

Kollajen membranlar üzerine yapılan ekim sonrasında fibroblastların 3-4 tabakalı yığılım oluşturduğu görüldü. Fibroblastların nispeten birbirinden uzak yerleşim gösterdiği ve aralarının bağ dokusu matriksi ile dolduğu belirlendi (Resim 4.10.).



Resim 4.10. Kollajen membran grubu. Birbirinden uzak yerleşim gösteren fibroblastlar arası yoğun matriks oluşumu (↙). M-T boyama, X 120. Bağ dokusu matriksi: Lila rengi, kollajen membran lifleri: Mavi renk .

Tüm kesitlerde yeni oluşan bağ dokusu matriksinin sadece yüzeyde bulunmadığı, aynı zamanda fibroblastlarla birlikte kollajen membran lifleri arasında ilerlediği ve membranla bütünleştiği tespit edildi (Resim 4.11.).

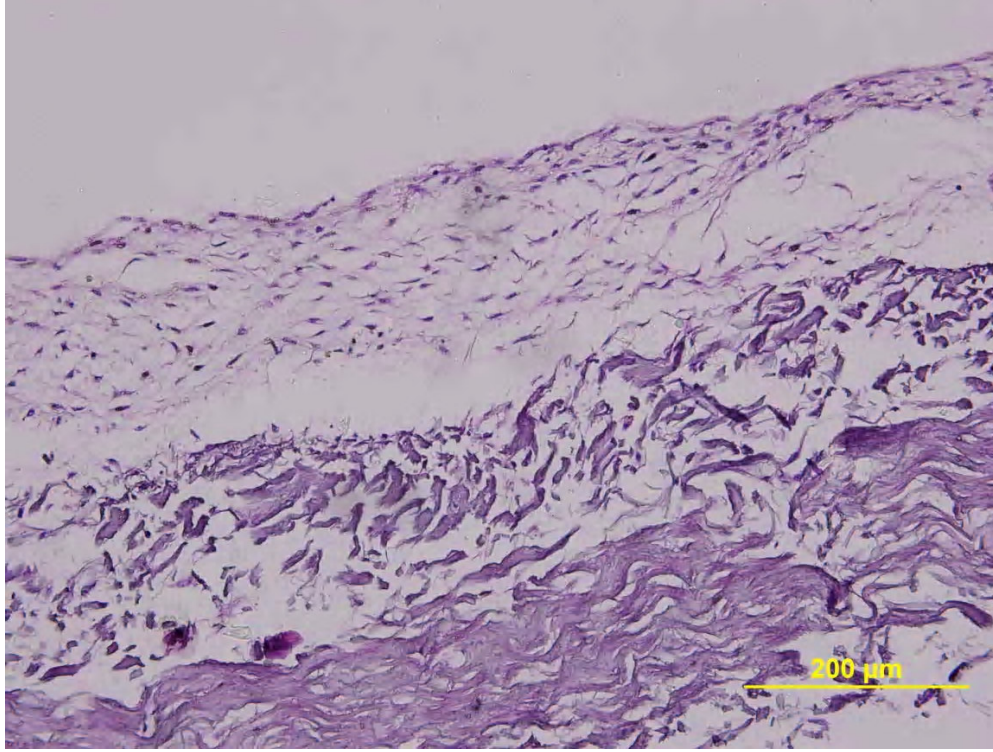


Resim 4.11. Kollajen membran lifleri arasına ilerlemiş ve onunla bütünleşmiş bağ dokusu (---). H-E boyama, X40



Resim 4.12. Kollajen membran grubu. M-T boyama, X20.

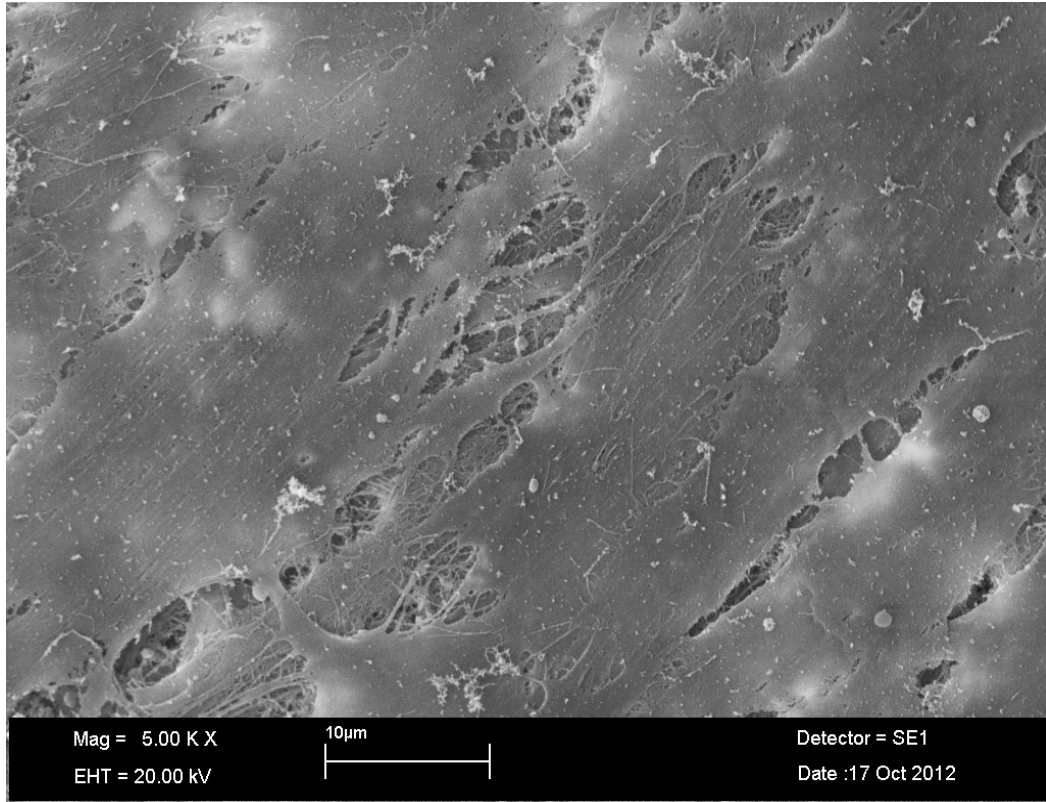
Çalışmaya katılan iki bireyin eksplant kesitlerinde, fibroblast proliferasyonunun çok, ancak kollajen üretiminin az ve iplikçik şeklinde olduğu görüldü (Resim 4.13.).



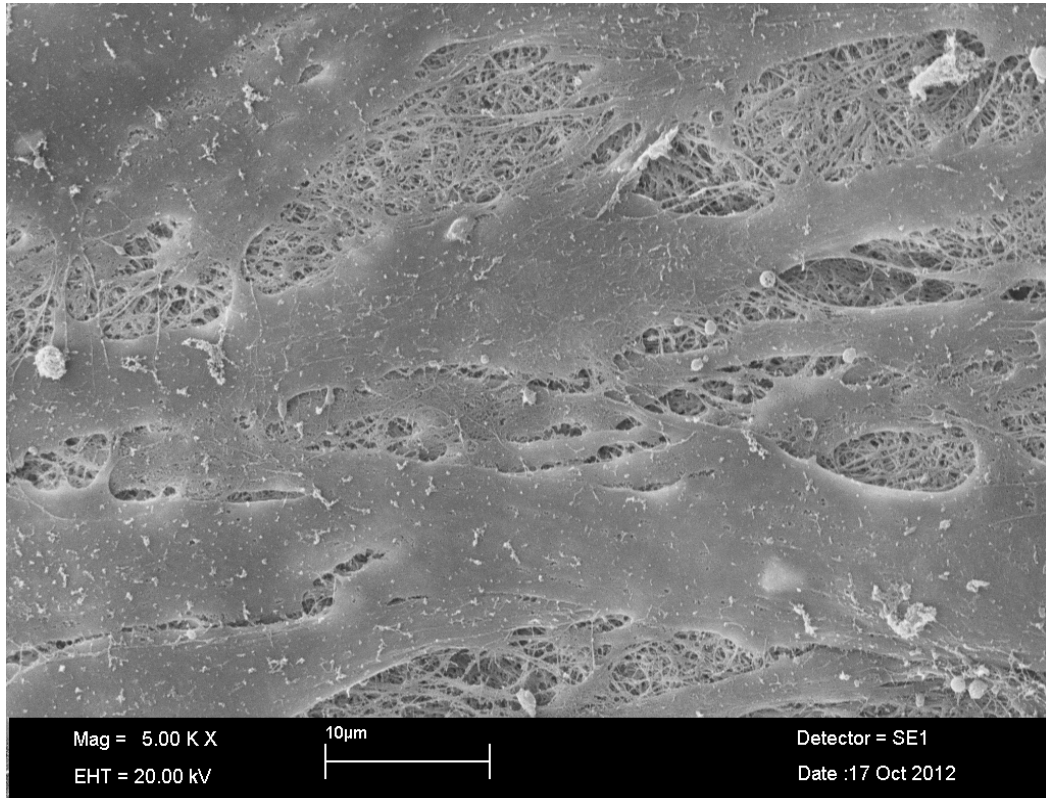
Resim 4.13. Kollajen membran üzerinde sık dizilenmiş fibroblastlar ve ince kollajen lifler .H-E boyama, X 40.

4.3. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) BULGULARI

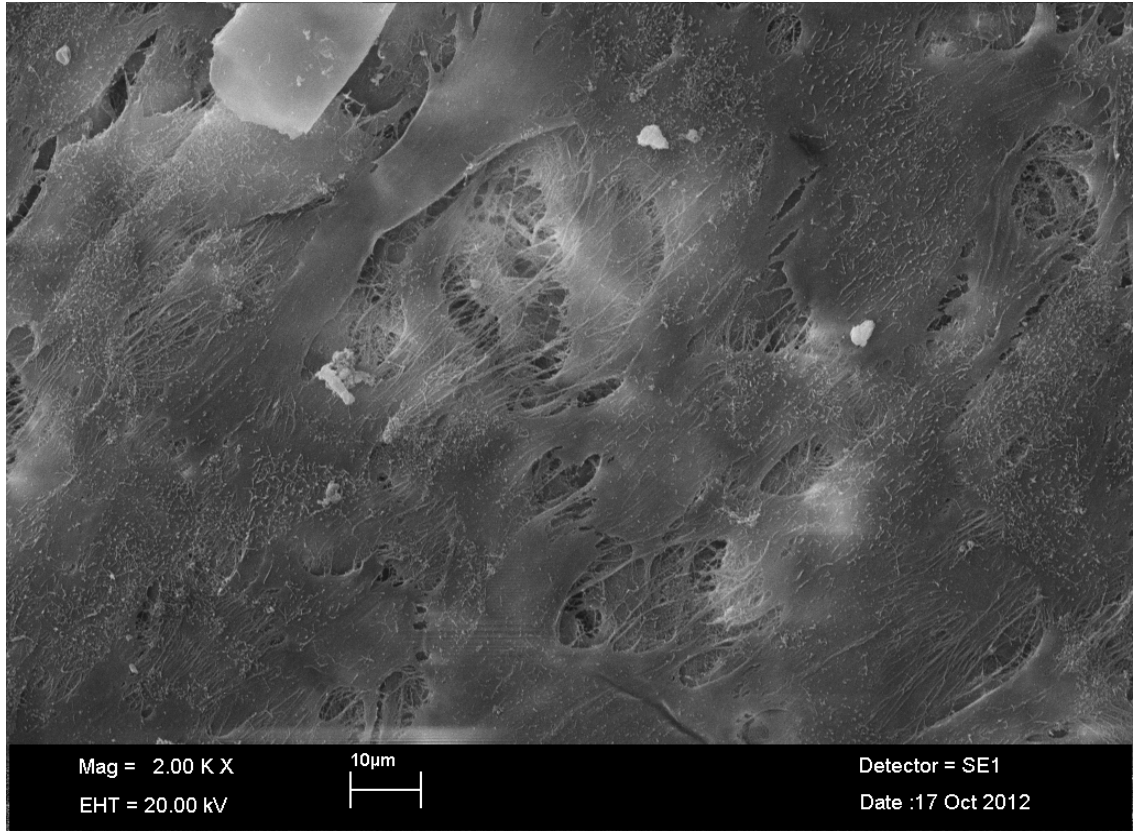
İncelenen tüm gruplarda SEM görüntüleri birbirine benzerdi. Her membran grubunda dişeti fibroblastlarının ekim sonrası yedinci günde iğsi ve uzamış sitoplazmik uzantıları ile çok sayıda filopodlara sahip oldukları, hücre-membran ve hücreler arası kollajen bağlantılar oluşturdukları, membranı kapladıkları ve katmanlaşma gösterdikleri belirlendi.



Resim 4.14. PZF membran grubu. Membran yüzeyinin tamamen bağ dokusu ile kaplanması.

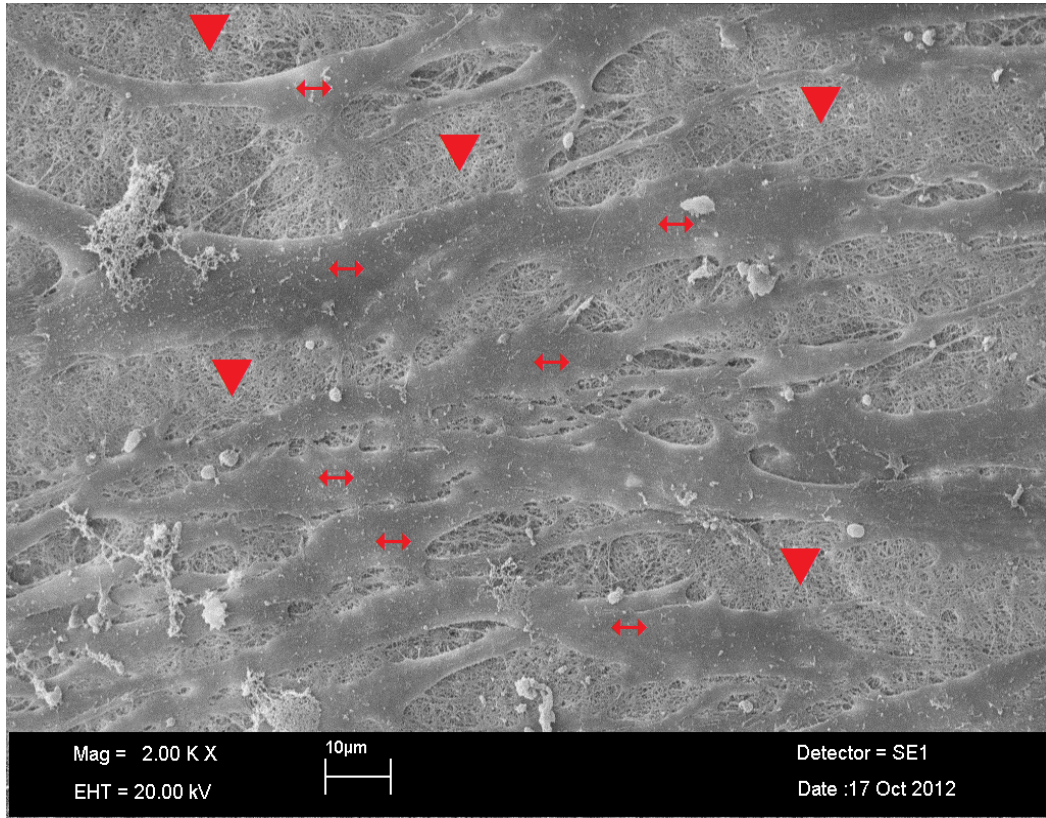


Resim 4.15. PZF/kollajen membran grubu. Bağ dokusu ile kaplanmış membran yüzeyi.

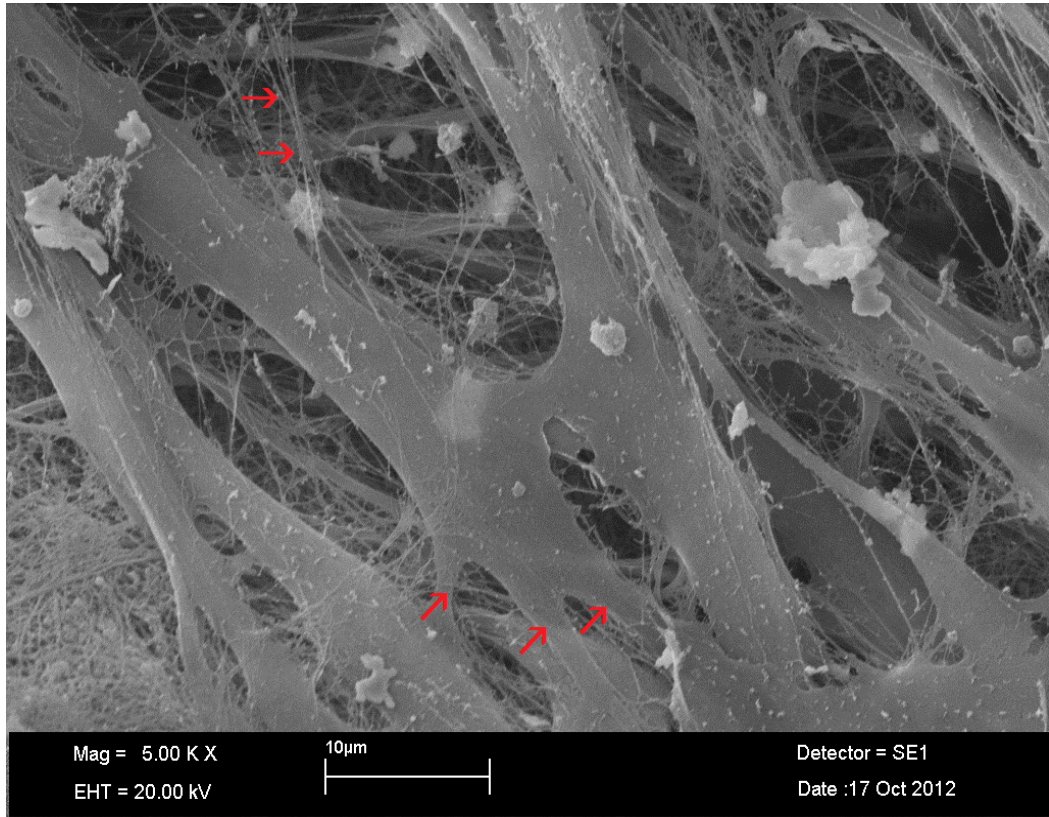


Resim 4.16. Kollajen membran grubu. Bağ dokusu ile kaplanmış membran yüzeyi.

PZF grubunda fibroblastların birbirine filopodlar ile bağlandığı ve fibroblastlar arasında üç boyutlu yapıda, gevşek dizinlenmiş kollagen liflerin sentezlendiği görüldü (Resim 4.17., Resim 4.18.).

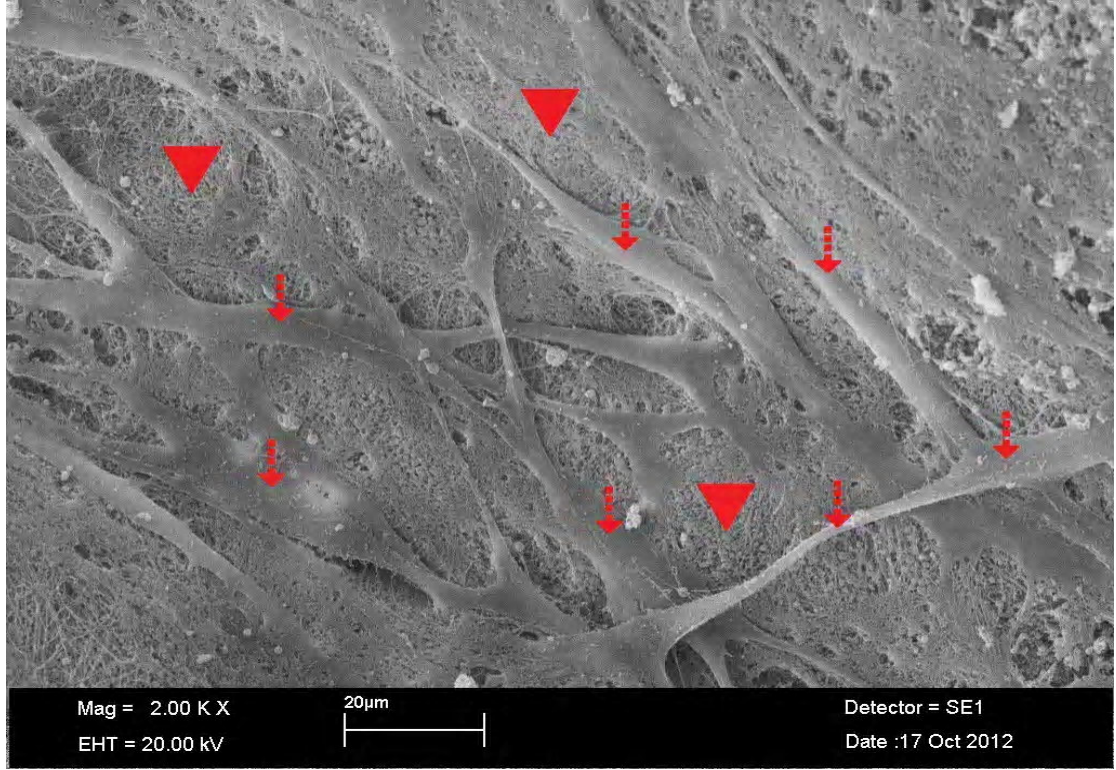


Resim 4.17. PZF membran grubu. Fibroblastların membran üzerinde yerleşimleri, PZF membran yüzeyi (▼), Fibroblastlar (↔).

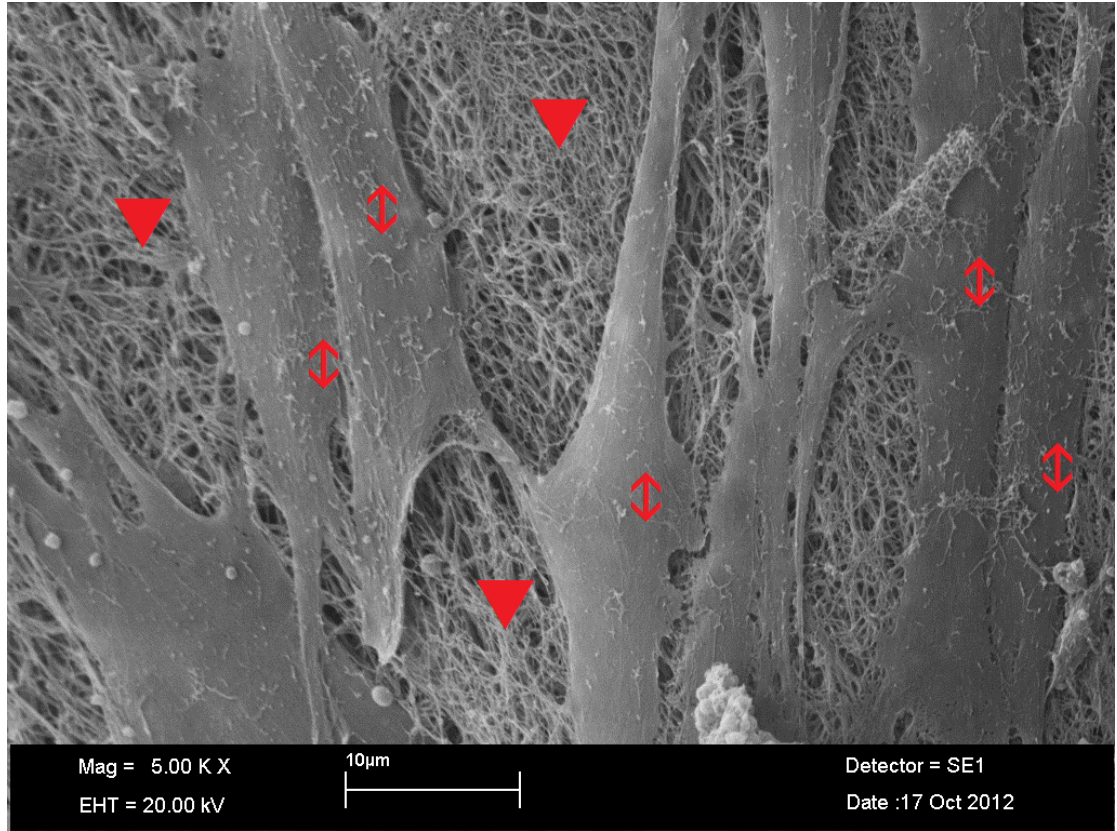


Resim 4.18. PZF membran grubu . Filopodlar (↗), fibroblastlar tarafından sentezlenmiş kollajen lifler (→)

PZF/kollajen grubunda fibroblastların pzf üzerine sıkıca tutunduğu, sentezlediği kollajen liflerin PZF'ye ait fibrin ağı ile karıştığı gözlemlendi.(Resim 4.19, Resim 4.20).



Resim 4.19. PZF/kollajen membran grubu. PZF membran(▼) üzerinde fibroblastların (⇓) yerleşimi.



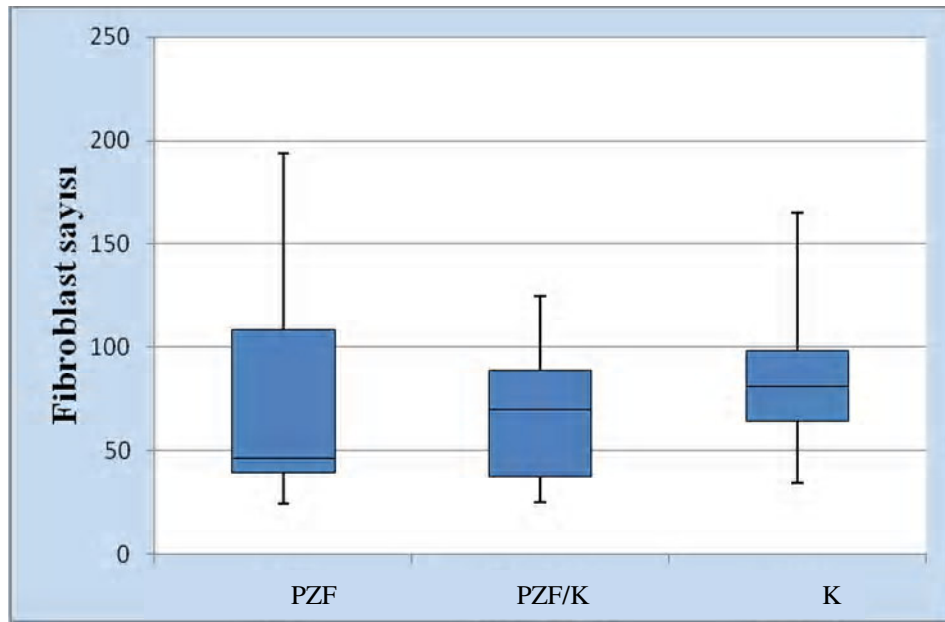
Resim 4.20. PZF/kollajen membran grubu. PZF yüzeyinde fibrin ağ (▼), fibroblastlar (↕).

Kollajen membran grubunda membrana ait lifler kalın yığılmalar şeklindeyken, fibroblastlar tarafından yeni üretilmiş kollajen lifler hücreler arası iplikçikler görünümündeydi (Resim 4.21).

4.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

4.4.1. Fibroblast Sayısı Bulguları

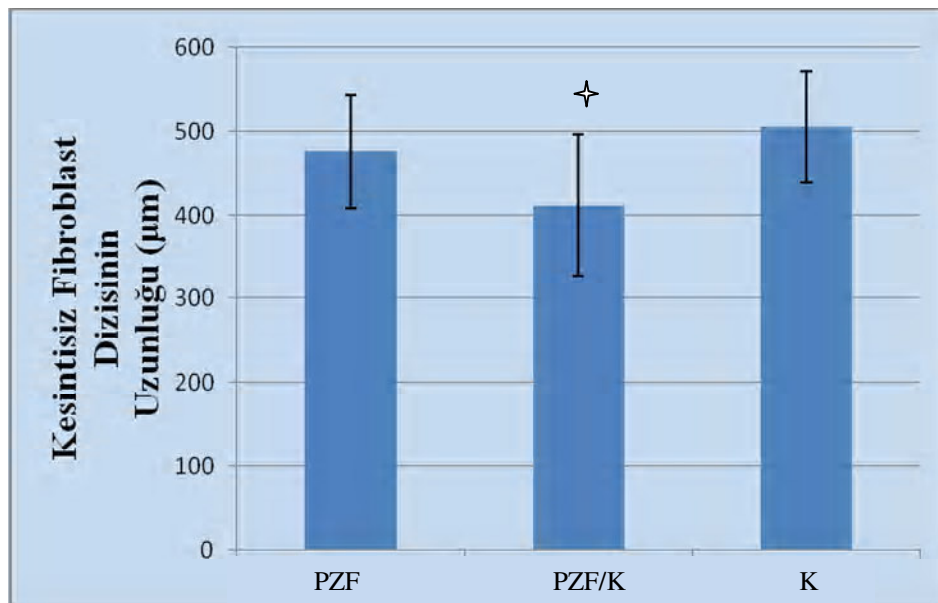
Veri setinin Kolmogorov-Smirnov testinde normal dağılıma uymadığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bu yüzden tekrarlayan ölçümlerde Friedman varyans analizi kullanılmıştır. Bu testin sonuçlarına göre gruplar arasında hücre sayısı açısından farklılık gözlenmemiştir ($p = 0.128$).



Şekil 4.1. Eksplant kesitlerindeki fibroblast sayısı değerleri $p>0.05$.

4.4.2. Kesintisiz Fibroblast Dizisi Uzunluğu

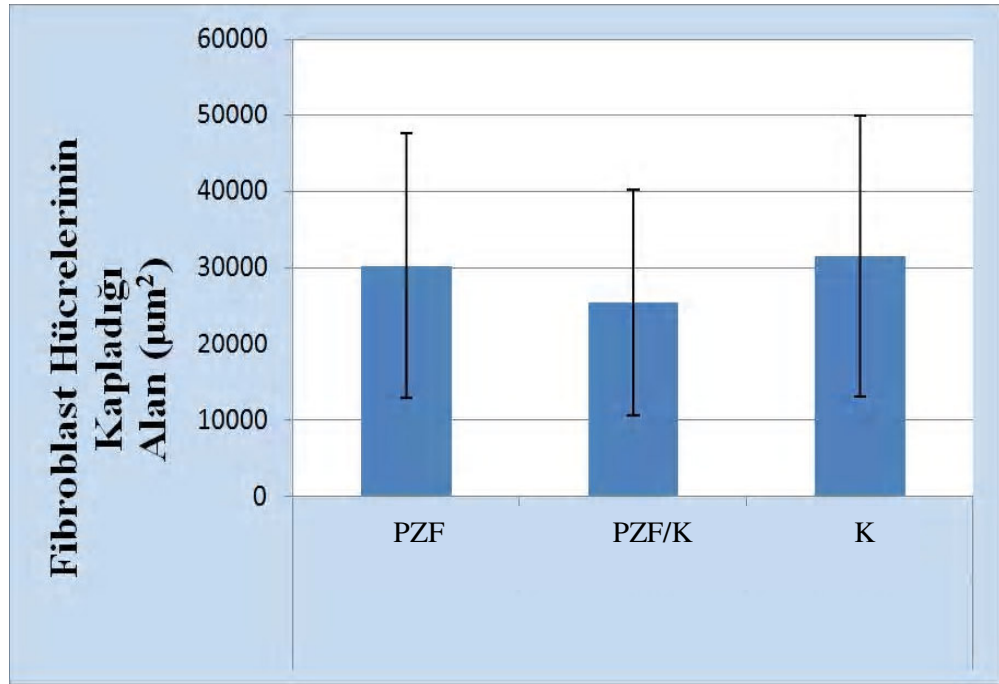
Veri setinin Kolmogorov-Smirnov testinde normal dağılıma uygunluğu gözlenmiştir ($p=0.221$). Bu nedenle tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Bu testin sonuçlarına göre PZF, PZF/kollajen ve kollajen membran gruplarında kesintisiz fibroblast dizisi uzunluğu bakımından fark gözlenmiştir ($p=0.002$). Tukey Post-hoc testi bu farkın PZF/kollajen grubu ve diğer gruplar arasında olduğunu ortaya koymuştur ($p<0.05$); PZF/kollajen grubu düşük değerler göstermektedir.



Şekil 4.2. Eksplant kesitlerindeki kesintisiz fibroblast uzunluğu değerleri $p<0.05$.

4.4.3. Fibroblast Hücrelerinin Kapladığı Alan

Veri setinin Kolmogorow-Smirnov testinde normal dağılıma uygunluğu gözlenmiştir ($p=0.095$). Bu nedenle tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Tüm membran grupları arasında fibroblastların kapladığı alanlar bakımından istatistiksel olarak farklılık gözlenmemektedir ($p=0.455$).



Şekil 4.3. Eksplant kesitlerindeki fibroblastların kapladığı alan $p>0.05$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sağlıklı periodonsiyumun devamlılığı yeterli dişeti ile sağlanabilmektedir. Dişeti çekilmeleri sonucunda dentin hassasiyeti, kök çürükleri, estetik kayıplar ve ileri durumlarda diş kaybı gibi sorunlar meydana gelebilir. Yapışık dişeti miktarını artırmaya ve kök örtümüne yönelik tedaviler ile bu sorunlar giderilmeye çalışılmaktadır. Günümüzde uygulanmakta olan farklı dişeti ogmentasyon işlemleri arasında kök örtümünde altın standart olarak tanımlanan yöntem, saplı fleplerle birlikte uygulanan supepitelyal bağ dokusu greftleridir (1). Ancak bu yöntemin ikinci bir yara sahası oluşturması, greftin eldesi için ekstra zaman gerektirmesi, yetersiz greft elde edilebilme riski taşınması, verici saha morbiditesi ve operasyon sonrası ağrı gibi kısıtlamaları mevcuttur. Doku mühendisliği ile ex vivo ortamda oluşturulabilecek oral mukoza veya bağ dokusu grefti eşdeğerleri bu kısıtlamaları ortadan kaldırmayı hedeflemektedir. Bilgilerimiz dahilinde, literatürde PZF ve kollajen membranlar üzerinde insan dişeti fibroblastlarının ekimiyle oluşturulan eksplantların histolojik olarak incelendiği ve karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın birinci amacı PZF membran ve kollajen membran üzerinde insan dişeti fibroblastı kültürü ile ex vivo oluşturulan iki greft materyalini histolojik olarak karşılaştırmaktır. İkinci amacı ise PZF membranın kollajen membran ile desteklenmesi durumunda büyüme hormonları içeren PZF'nin hücre proliferasyonuna etkisinin araştırılmasıdır.

Simain-Sato ve ark. (251) ratlarda yaptıkları çalışmada dişeti biyopsi örneklerinden izole edilen fibroblastlar ile in vitro şartlarda bağ dokusu elde edilebileceğini ve bu fibroblastların biyoemilimli membranlar üzerine ekilebilir olduğunu ifade etmişlerdir (252). Bu literatür bilgisi ışığında çalışmamızda oluşumunu hedeflediğimiz dişeti bağ dokusu için palatinal dişetinden izole edilen insan dişeti fibroblastlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Periodontal ligament fibroblastları da oluşturulmak istenen bağ dokusu

modeli için kullanılabilir. Ancak izolasyonlarının zorluğu ve hızlı üreme ile birlikte gelen hızlı enfeksiyon riski, dişeti fibroblastlarını tercih etmemizin nedenlerindendir. Araştırmalar periodontal ligamentten elde edilen heterojen hücre topluluklarının osteoblast, sementoblast, veya periodontal ligament hücrelerine dönüşebilme kapasitesine sahip olduklarını öne sürmektedir (253, 254). Çalıştığımız laboratuvar koşullarında hücrelerin farklılaşmasını kontrol altında tutmanın da güçlüğü göz önünde bulundurularak, diğer hücrelere farklılaşma ihtimali olan kök hücrelerini daha az miktarda barındıran dişeti fibroblastlarının çalışmamızda kullanılması uygun görülmüştür.

Dişeti biyopsilerinin alınması amacıyla sistemik olarak sağlıklı, sigara kullanmayan, devamlı ilaç kullanım zorunluluğu bulunmayan ve yaşları birbirine yakın bireyler seçilmiştir. Seçim kriterleri oluşturulurken enfeksiyon riskinin azaltılması, ilaca bağlı fibroblast proliferasyonundaki değişimlerin engellenmesi ve yaş ile ilişkili hücre proliferasyonuna etki edebilecek mitojenik aktivite farklarının minimize edilmesi hedeflenmiştir. Dişeti biyopsileri özellikle çekim endikasyonu konulmuş üst çene 20 yaş dişlerine komşu palatinal dişetinden alınmıştır. Alt çene 20 yaş dişi komşuluğundaki keratinize dişetin çoğunlukla yetersiz ve enflame olması bu bölgeden dişeti biyopsisi alınmasını imkansız kılmıştır. Biyopsilerin elde edilmesinde punch yerine alveoler kemik düzlemine 45 derece açıyla yerleştirilmiş ve periosteuma tek noktadan temas eden 15C bistüri ucu kullanılmıştır. Bu yöntem minimal periosteum hasarı ve dolayısıyla minimal operasyon sonrası ağrı ile sonuçlanmıştır. Konik formda dişeti biyopsi materyali elde edilmesi, yara bölgesindeki yumuşak doku iyileşmesini hızlandırmıştır.

Literatür incelendiğinde, dişeti ya da periodontal ligament fibroblastlarının membranlar üzerine ekimlerinin gerçekleştirildiği çalışmalarda fibroblastların 2., 3. ve 4. pasajlarının kullanıldığı göze çarpmaktadır (203, 205, 206). Çalışmamızda da dişeti biyopsilerinden elde edilen fibroblastların 2. ya da 3. pasajları membran üzerine ekim için kullanılmıştır. Liu ve ark.'nın (255) çalışmasında, mezenşimal kök hücrelerin uzun süreli kültürlerinde kanser hücrelerine dönüşebileceği belirtilse de, maligniteye eğilim gösteren dişeti fibroblastlarını rapor eden bir çalışma bulunmamaktadır (206). Her ne kadar çalışmamız histolojik inceleme esasına dayansa ve oluşturulan eksplantın insana nakli gerçekleştirilmese de, pasajladığımız fibroblastların morfolojik özellikleri inverted

mikroskop altında incelenerek fenotipik bir değişiklik gösteren ya da saf fibroblast kültürü olmadığını düşündüğümüz bir kültür flaskı çalışma dışı bırakılmıştır (Resim 3.21).

Çalışmamızın başlangıcında eşit büyüklükte dişeti biyopsileri almamıza rağmen, her bireyin dişeti biyopsisinden farklı sayıda hücre elde edilmiştir (Resim4.1.). Bu durum eşit hacimlerdeki dokularda farklı sayıda hücre ve farklı miktarda ara madde oluşuyla açıklanabilir ki, bu durum ancak bireysel farklılıklarla ilişkilendirilebilir.

Fazla sayıda fibroblast içeren veya üreme hızının fazla olduğu flasklarda 15 gün içinde 3 kez pasajlanarak %80 konfluense ulaşılırken, fibroblastların az olduğu veya üreme hızının yavaş olduğu flasklarda 15. günde 2. pasajda %80 konfluense ulaşılmıştır. PZF'in hücre proliferasyonunu artırdığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur. Tsai ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada PZF'nin 3 günlük hücre kültürlerinde, osteoblastların, dişeti fibroblastlarının ve periodontal ligament fibroblastlarının proliferasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (256). Wu ve ark. yaptıkları bir çalışmada PZF'nin osteoblast ataşmanını, proliferasyonunu ve kollajen ilişkili protein üretimini artırdığını belirtmişlerdir (257). Ayrıca Huang ve ark. çalışmalarında PZF'nin dental pulpa hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını stimüle ettiğini bildirmişlerdir (258). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda 15. günde %80 konfluense ulaşamayacağını öngördüğümüz iki fibroblast kültürüne, biyopsileri aldığımız bireylerden elde ettiğimiz PZF membranlar ilave ederek, proliferasyon düzeylerinin hedeflenen zamanda %80'e ulaşması sağlanmıştır. Çalışmamızda sözü geçen kültürlerle dair öngörümüz 7. veya 8. gününde tutunmaya ve çoğalmaya başlamış fibroblast sayısının diğer kültürlerle oranla çok az olduğu bulgusuna dayanmaktadır. Literatür bilgileri ışığında yaptığımız pilot çalışmalarda da tecrübe ettiğimiz üzere PZF dişeti fibroblastlarının üreme hızını artırmaktadır. Hücre kültürlerinin bu manipulasyonu, üreme potansiyeli fazla olan hücrelerin yaşlanmasını beklemeden, üreme hızı yavaş olan hücrelerin proliferasyon hızını artırarak, farklı bireylerden eşit zamanda, eşit sayıda hücre elde ederek membranlar üzerine ekeceğimiz fibroblastları zamansal ve sayısal açıdan standardize etmek amacını taşımaktaydı.

Günümüzde doku mühendisliği uygulamaları rejeneratif sahada sağladığı avantajlardan dolayı yaygınlaşmaya başlamasıyla beraber, in vitro ortamdaki oksijen yetersizliği ve beslenme zorluğu gibi etkenler doku yapımını zorlaştırmaktadır. Yeni dokunun

üretilebilmesi ve bu dokunun fonksiyonel olabilmesi için uygun biyomateryalin seçimi çok önemlidir (259). Literatürde doku mühendisliği yöntemleri ile oral yumuşak dokuların oluşturulmasında farklı doku iskeleleri kullanılmıştır. Bu çalışmalarda benzil ester hiyaluronik asit (29), tip1 ve 3 kollajen (30, 31), poliglaktin meş (32, 33), ADMA (34) ve kitosan (35) allojenik ya da otojen fibroblast kültürü ile birlikte kullanılan doku iskeleleridir. Membranlar uzun yıllardan beri periodontal ve peri implant defektlerin tedavisinde YDR ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) işlemlerinde kullanılmaktadır (260). Domuz ve sığır kaynaklı Tip 1 ve 3 kollajen içerikli membranlar sıklıkla kullanılanlardır (261). Kollajenler ile ilgili en önemli problem hayvan kaynaklı olması ve immunolojik reaksiyon gibi hayvan-ilişkili enfeksiyöz ajanları taşıyabilme kapasitelerinin bulunmasıdır (262, 263). Bununla beraber yıllardır hayvan kaynaklı kollajenler yumuşak doku ogmentasyonu, hemostatik ajan, yara örtüsü ve vasküler greft örtüsü olarak kullanılmaktadır (264). Kollajen membranların pıhtı oluşumundaki aktif rolü, periodontal bağ dokusunun temel elemanları olan periodontal ligament ve dişeti fibroblastlarına kemotaktik etkisi diğer biyoemilimli sentetik membranlardan daha üstün olduğunu düşündürmektedir (265, 266).

Fibrinojen temelli hücre kültürü sistemlerinin felsefesi hücre ataşmanını (267), proliferasyonunu (268) ve farklılaşmasını (269) artırması esasına dayanmaktadır. Bazı çalışmalarda (270, 271) fibrinin insan mezenşimal kök hücrelerinin kolonizasyonu için uygun doku iskelesi olabilme durumu araştırılmıştır. Farklı fibrinojen konsantrasyonlarına bağlı olarak insan mezenşimal kök hücrelerinin farklı yapışma, yayılma ve çoğalma sergilediği gözlenmiştir (272). Perka ve ark. (273) periosteal hücreler ve kondrositler gibi farklı hücre tiplerinin trasplantasyonu için biyoemilebilir fibrin aljinat taşıyıcı geliştirmişlerdir.

Trombositler (plateletler) disk şeklinde, periferel kanda bulunan, çekirdeksiz hücrelerdir (274). Plateletler, hücre mitozunu ve kollajen yapımının artışını sağlayan, diğer hücreleri yara bölgesine toplayan, vasküler gelişimi başlatan ve hücre farklılaşmasını indükleyen önemli büyüme faktörleri içerirler (275). PZF, içinde platelet kaynaklı büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinlerin hapsoldüğü, güçlü fibrin ağ yapısından meydana gelen otolog bir biyomateryaldir (215). PZF doku mühendisliği çalışmalarında hücre ekimi için biyoiskelet olarak kullanılabilir. Plateletten zengin fibrinin periosteal doku mühendisliğinde kollajen membran ile karşılaştırıldığı bir çalışmada

(39), insan periosteal hücre proliferasyonunun PZF üzerinde daha fazla olduğu, biyouyumluluğunun da kollajen membrana yakın ancak yine de ondan üstün olduğu gösterilmiştir.

Amniotik membranın literatürde yumuşak doku grefti (276), dişeti yaralanmalarda iyileşmeyi hızlandırıcı örtü (277), doku mühendisliği çalışmalarında tavşan epitelyal hücre kültürlerinde substrat (278), oral rekonstrüksiyon amaçlı insan oral epitelyal ve periodontal ligament hücrelerine (279) ve oral mukoza yapımı için tavşan oral keratinosit kültürüne doku iskelesi olarak (280) kullanıldığı araştırmalar mevcuttur. Kolay elde edilebilen, maliyetsiz olan ve daha önceki pilot deneylerimizde üzerinde insan dişeti fibroblastlarının proliferasyonunu değerlendirdiğimiz bu membrana çalışmamızda doku iskelesi olarak yer vermeme nedenimiz kanda rutin testlerde tespit edilemeyen yani pencere döneminde olan hepatit gibi viral hastalıkların iletibilmesine sebep olabilmesidir (281).

Çalışmamızda bu bilgilerden yola çıkılarak kollajen membran ve PZF doku iskeleleri olarak seçildi. Kollajen membran seçiminde, bir çok ticari ürün arasından özellikle Bio-Gide kollajen membran kullanılmasına karar verilmiştir. Bu seçimde insan periodontal ligament fibroblast ve osteoblast benzeri hücre kültürlerinde farklı kollajen membranların biyouyumluluğunun ve hücre proliferasyonunun değerlendirildiği bir çalışma (205) referans alınmıştır. Söz konusu çalışmada insan periodontal ligament fibroblast ve osteoblast benzeri hücrelerin en fazla sayıda incelenen diğer kollajen membranlardan ziyade Bio-Gide kollajen membran üzerinde yapışarak çoğaldığı öne sürülmüştür. Üçüncü çalışma grubu olarak PZF/kollajen membranın çalışmaya dahil edilmesinin nedeni ise kombine kullanımın fibroblast proliferasyonuna etkisinin araştırılması idi. Bu grubun çalışmaya dahil edilme sebebi, rezorpsiyon hızı yüksek olan PZF membrana boyutsal stabilitesini uzun süre koruyan ve çözünme hızı çok daha yavaş olan kollajen membran ile fiziksel destek sağlandığında, hücre proliferasyonunun bu durumdan nasıl etkilendiğinin sorgulanmasıydı.

Membranlar üzerine hücre ekiminin gerçekleştirildiği bazı çalışmalarda (206) birim yüzey alanına ekilen hücre sayısı hesaplanarak standardizasyon sağlanırken, kimi çalışmalarda da membran yüzeylerine ekilen total hücre sayısı hesaplanarak standardizasyon sağlanmaktadır (282). Daha önceki pilot çalışmalarımızda da tecrübe ettiğimiz üzere, bireysel farklılıklarla ilişkili olarak farklı boyutlarda elde edilebilen

PZF membranlar kültür ortamında farklı zamanlarda ve farklı hızlarda bozunmaya uğramakta yani, boyutsal stabilitesini zamanla kaybetmektedirler. Deney süresince sabit yüzey alanına sahip olmayan PZF membranların üzerindeki fibroblastların fibrin ağın bozunması sürecinde kimi zaman flaska kimi zaman da yeniden PZF'ye tutunduğu gözlenmiştir. Bu durum standardize edebileceğimiz parametrenin başlangıçta membranlar üzerine ekilen total hücre sayısı olduğunu göstermektedir. Bu bilgiler ışığında, fibroblast ekimi gerçekleştirirken, başlangıç total hücre sayısının her membran grubu için eşit sayıda olmasına dikkat edilmiştir. PZF'nin kollajen membrana oranla boyutsal stabilitesini hızlı bir şekilde kaybetmesi bir dezavantaj gibi görünmektedir. Ancak, ex vivo bağ dokusu eşdeğeri üretilmesi ve insana nakledilmesi planlandığında bu çalışma süresi kısaltılabilir. Hücreler membranlar üzerine ekilmek için flasklardan kaldırıldıktan kısa bir süre sonunda doku iskelelerine yapışarak proliferasyon olmaya başlarlar. Proliferasyon fazı daha sonra yerleştirildikleri doku içinde de devam edebilir. Bu strateji ile iskele yapısı içinde hücre nakli gerçekleştirilmiş olmakla beraber, rezorpsiyon sonucu kaybedilen hücrelerin sayısı da minimuma indirgenmiş olur. Çalışmamızda 1 haftalık süre sonucundaki bağ dokusu özelliklerinin histolojik olarak incelenmesi hedeflendiğinden dolayı deney süresi uzun tutulmuştur. Dişeti fibroblastların ve membranlarla oluşturulan eksplantların hastalara 2 veya 3 gün inkübasyon süresi sonrasında nakledilebileceğini belirten çalışmalar mevcuttur (206).

Literatür incelendiğinde hücre kültürü için genellikle %10 Fetal Sığır Serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium'ın (DMEM) kullanıldığı göze çarpmaktadır (206, 283, 284). İmmunolojik reaksiyon riskinin azaltılması amaçlanarak farklı kültür medyumlarının kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Yamada ve ark.'nın (285) yaptıkları bir çalışmada, bileşiminde hayvan içeriği bulunmayan kültür medyumunu kullanarak çoğaltılan fibroblastlar ve kollajen sünger ile oluşturulan eksplantın, yumuşak doku ogmentasyonunda güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi rapor edilmiştir. Bayar'ın (202) çalışmasında da yine hayvan kaynaklı herhangi bir besleyici materyal içermeyen kültür ortamında 11. günde vücut dışında üretilmiş histolojik olarak ağız mukozası eşdeğeri bir ürün elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız doku kültürü medyumunu Bio-AMF 1, ilave içeriğinde fetal sığır serumu (FBS) bulundurmaktadır. Çalışmamızda bu medyumunu tercih etme nedenimiz; gerçekleştirdiğimiz pilot çalışmalarda fibroblast kültürü için kullandığımız farklı iki doku medyumundan Bio-AMF 1'in hücre proliferasyon hızı ve enfeksiyon kontrolünde

diğer medyuma oranla daha başarılı sonuçlar vermesidir. İn-vitro dizayna sahip olan çalışmamızda hayvan içerikli doku kültürü medyumunu kullanma sakıncasının bulunmaması bu medyumunu tercih etmemizde ikinci bir neden olarak gösterilebilir. Bununla beraber, farklı çalışmalarda hayvan içeriği ihtiva eden medyumlarla oluşturulmuş doku mühendisliği ürünlerinin insana nakli sonucunda herhangi bir immunolojik reaksiyonun görülmediği de literatür bilgilerimiz dahilindedir. Köseoğlu ve ark.'nın (206) yaptıkları çalışmada DMEM kullanılarak in vitro elde edilen kollajen membranlar üzerine ekilmiş fibroblast kültürlerinden oluşan eksplantların dişeti çekilmesi bulunan bireylerde kullanılması sonucunda herhangi bir immunolojik reaksiyon rapor edilmemiştir. Söz konusu çalışmada hücrelerdeki FBS artıklarının temizlenmesi için eksplantın 5 kez fosfat tamponlu serum (PBS) ile yıkanmasının yeterli olduğu belirtilmiştir.

'Papilla priming' işlemi ilk kez 2007 yılında McGuire ve ark. (286) tarafından dişeti papili rekonstrüksiyonu gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır. Hastaların dişeti biyopsilerinden izole edilen ve FBS kullanılarak kültür ortamında çoğaltılan otojen fibroblast hücreleri açık interproksimal bölgede bulunan dişeti dokusu içine enjeksiyon yöntemi ile nakledilmiştir. Araştırmacılar yöntemin dişeti papili rekonstrüksiyonunda başarılı ve güvenilir olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Surana ve ark. da (287) bu yöntemin interproksimal papil yüksekliğini artırmada güvenilir ve komplikasyonları olan cerrahi yöntemlere göre hastalar tarafından daha kolay kabul edilebilir olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu vaka raporunda da kültür medyumunu hayvan içerikli olup, hücrelerin medyumdan izole edilmesi için santrifüj kullanılmış ve PBS ile seyreltilen hücre süspansiyonu interdental papillere enjekte edilmiştir. Her iki 'papilla priming' çalışmasında da immunolojik yanıt rapor edilmemiştir.

Çalışmamızda incelenen histolojik kesitlerde her membran grubunun ekim gerçekleştirilen yüzeyinde ve iç kısımlara doğru prolifer olmuş fibroblastlardan oluşan bağ dokusu gözlenmiştir. Yamada ve ark. (285) dişetinden izole ederek çoğalttıkları dişeti fibroblastlarını farklı medyumlar kullanarak kollajen süngerler üzerine ekmişler ve oluşturulan eksplantları dokuzuncu günde fikse ederek histolojik olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde, hematoksilin-eozin boyaması yapılan kesitlerde eksplantların içinde ve özellikle ekim gerçekleştirilen üst yüzeylerde fibroblastların prolifer olduğunu bildirmişlerdir.

Herhangi bir substra karşı afiniteyi belirleyen faktör hücrelerin morfolojik özellikleridir. Ataşman gösteren fibroblastların morfolojik özelliklerinin incelenmesi gerek kök yüzeyinin gerekse biyomedikal materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Fibroblastlar gibi yassı hücreler afinite gösterdikleri substratlara birçok sayıda ataşman ile bağlanır, yassılaşır, uzar ve lamellopodlar oluşturur (288). SEM görüntülerinde tüm membran gruplarında fibroblast bulunduğu, fibroblast katmanları arasında kollajen sentezinin gerçekleştiği ve fibroblastların altındaki yapılara birçok içsi lamellopodlarla bağlandığı gözlenmiştir. Bu bulgular çalışmamızda kullanılan membran gruplarının biyouyumluluklarının iyi olduğunu ve ex vivo oluşturulabilecek eksplantlar için uygun birer doku iskelesi olabileceklerini göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları Rothamel ve ark.'nın (205) farklı kollajen membranların biyouyumluluklarını değerlendirdikleri çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızın SEM görüntüleri PZF membran ve PZF/kollajen membranın da biyouyumluluğunun kollajen membrana benzer olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda bireylere göre sınıflandırılmış her membran grubuna ait rastgele seçilen histolojik kesitlerde membranlar üzerindeki fibroblast sayısı, kesintisiz fibroblast dizisi uzunluğu ve fibroblastların kapladığı alan belirlenmiştir. Proliferasyonun değerlendirilmesi amacıyla yapılan fibroblast çekirdeklerinin sayımı sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Eşit sayıda fibroblast ekimi yapılan membranlarla oluşturulan eksplantların inkübasyon periyodu sonrası alınan kesitlerinde benzer sayıda hücre çekirdeğinin bulunması, her eksplant grubundaki diyeti fibroblastlarının proliferasyon düzeylerinin birbirine yakın olduğuna işaret etmektedir.

Membranlar üzerinde fibroblastların kapladığı alanlar açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farkın olmaması her membran grubu üzerinde yaklaşık benzer kalınlıklarda ex vivo oluşturulmuş bağ dokusu elde edildiği şeklinde yorumlanabilir. 'Eşit fibroblast ile kaplı yüzey alanı X üst üste dizilmiş eşit sayıda kesit = eşit hacimde bağ dokusu' ifadesi bu durumu matematiksel olarak da doğrulamaktadır.

Kesintisiz fibroblast dizisi uzunluğu bakımından PZF/K grubunda PZF ve K gruplarına göre daha düşük değerler gözlenirken, PZF ve K gruplarındaki değerler birbirine yakındır. Bu durum, PZF'nin kollajen membran üzerinde rezorbe olurken fibroblast

dizilerinin bozularak kollajen membran üzerine tutunmaları ve prolifer olmalarıyla açıklanabilir. PZF/K grubuna ait histolojik kesitlerde fibroblastların her iki membran yüzeyinde de prolifer olduğu görülmektedir. Ölçümler bu grupta PZF üzerinde yapılmıştır. Dolayısıyla PZF'den ayrılarak kollajen membran üzerinde çoğalmaya başlayan fibroblastlar kesintisiz fibroblast dizisi uzunluğuna dahil edilmemiştir.

Gassling ve ark.'nın (39) PZF ve kollajen membranlar üzerinde insan periosteal hücrelerinin proliferasyon özelliklerini ve membranların biyouyumluluklarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, PZF'nin her iki parametre açısından da kollajen membrandan üstün olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda proliferasyon ve biyouyumlulukların tüm eksplant gruplarında benzer olduğu bulgusu farklı hücre tiplerinin kullanılması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca söz konusu çalışmada hücre proliferasyonu değerlendirmesi MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,] 5-diphenyltetrazoliumbromide) testi, WST testi ve BrdU (5-bromo-2-deoksiuridin) testi kullanılarak gerçekleştirilirken, biyouyumluluk değerlendirmesi için LDH(laktat dehidrogenaz) testi ve SEM kullanılmıştır. Bu testler membranlar üzerine ekim yapılmasını takiben sırasıyla, 1.,7. ve 5. günlerde uygulanmıştır. Çalışmamız histolojik değerlendirme esasına dayandığından dolayı, bulgularımız biyomateryaller üzerine ekimin gerçekleşmesinden 7 gün sonra oluşturulan eksplantların histolojik kesit ve SEM incelemelerinden elde edilmiştir. Sonuç olarak her iki çalışma arasındaki metodolojik farklılıklar bulgular arasındaki farklılıkları açıklayabilir.

Hojo ve ark. (289), farelere transplante edilen fibrin ve kollajen jellere dermal fibroblast ve epidermal keratinositlerin ekimi ile elde ettikleri dermal eksplantları histolojik olarak incelemişlerdir. Transplantasyon öncesinde kollajen ve fibrin jellerle elde edilen eksplantlar arasında histolojik açıdan bir fark bulunmamıştır. Her iki materyal ve hücre grupları ile oluşturulan eksplantlarda transplantasyon öncesi fibroblast ve keratinosit proliferasyonları eşit bulunmuştur. Aselüler fibrin ve kollajen jellerin süpernatantlarında VEGF miktarları açısından anlamlı fark gözlenmezken, fibrin jel ile oluşturulmuş dermal eksplantın süpernatantındaki VEGF miktarı kollajen jel ile elde edilen dermal eksplanttakine oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu durum in vitro koşullarda fibrin ve kollajen jellerin fibroblast ve keratinositlerin proliferasyonu için benzer mikro çevre oluşturduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bununla beraber, VEGF miktarlarının hücre ekili fibrin iskelelerinin süpernatantlarında fazla olması, fibrinin

indüklediği hücrelerden VEGF sekresyonunun artmasıyla ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, çalışmanın in vivo bulguları in vitro bulgularından farklıdır. Fibrin jel ile elde edilmiş eksplantın transplantasyon sonrası 3. gün histolojik kesitlerinde epidermin fibrin yüzeyine iyi bağlantı sağlamış olduğu, transplantasyon yüzeyinde az miktarda enflamasyon hücresi ve belirgin düzeyde alkalın-fosfataz pozitif hücrelerin(vasküler endotelyal hücreler) varlığı gözlenmiştir. Kollajen jel ile elde edilen dermal eksplantın transplantasyon sonrası 3. gün histolojik kesitlerinde ise kollajenin atrofiye uğrayan bölümlerinden epidermin ayrıldığı, transplantasyon yüzeyinde bol miktarda enflamatuar hücre bulunduğu ve alkalın-fosfataz pozitif hücrelerin çok az sayıda olduğu gözlenmiştir. Alkalın fosfataz pozitif hücreler her iki eksplant kesitindeki rastgele 5 alandan sayılmış ve fibrin jel ile elde edilen eksplanttaki hücre sayısı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Fibrin jel ile oluşturulmuş eksplantın transplantasyon yüzeyine çok iyi adapte olduğu ve doğal doku ile devamlılık gösterdiği belirtilmiştir. Fibrin jel ile elde edilmiş olan eksplantın in vivo bulgulardaki üstünlüğü artmış VEGF'nin indüklediği vasküler endotelyal hücrelerin yara bölgesine migrasyonu ve proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızın bulguları Hojo ve ark.'nın çalışmalarının in vitro bulguları ile örtüşmektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde hücre olarak fibroblastlar, biyomateryal olarak ise kollajen ve PZF membranlar kullanılmıştır. Her iki çalışmada da benzer metodolojinin kullanılmış olması sonuçlardaki benzerlikleri açıklayabilir. Çalışmamızın in vivo basamağı henüz gerçekleştirilmemiştir ancak in vitro basamaktaki bulgu benzerlikleri PZF ile elde edilebilecek bağ dokusu eksplantlarının in vivo başarısının daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Kaldı ki, kullandığımız PZF sadece fibrin jelden oluşmamakta aynı zamanda fibrin ağı içinde hapsolmuş sitokin ve büyüme faktörleri de içermektedir. Başka bir deyişle, PZF fibrin jel ile karşılaştırıldığında daha üstün biyolojik özelliklere sahiptir.

Çalışmamızın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Kollajen membran ve PZF üzerinde fibroblast kültürü yöntemi ile bağ dokusu oluşturulabilir. Oluşturulan eksplantlar histolojik olarak benzer özelliktedirler.
- Kollajen membran ve PZF üzerindeki fibroblast proliferasyonu ve oluşan bağ dokusu miktarı açısından fark bulunamamıştır.
- Her iki membranın da biyoyumlulukları yüksektir ve doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanılabilirler.

- PZF'nin maliyetsiz elde edilebilir ve otojen olması diğer doku iskelelerine alternatif olabileceğini düşündürmektedir.
- PZF'nin kollajen ile desteklendiği durumda in vitro şartlarda dişeti fibroblastlarının proliferasyonuna ek bir katkısı saptanamamıştır.

Ancak, çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda PZF ile oluşturulabilecek eksplantların doku integrasyonu ve iyileşme potansiyeli açısından daha başarılı olacağını öngörmekteyiz. Gerek kollajen, gerekse PZF membranlarla oluşturulan eksplantların transplantasyon sonrası incelendiği, karşılaştırmalı, klinik ve histolojik kanıta dayalı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Chambrone L, Chambrone D, Pustiglioni FE, Chambrone LA, Lima LA. Can subepithelial connective tissue grafts be considered the gold standard procedure in the treatment of Miller Class I and II recession-type defects? J Dent 2008; 36: 659-671.
2. Camargo PM, Melnick PR, Kenney EB. The use of free gingival grafts for aesthetic purposes. Periodontol 2000 2001; 27: 72-96.
3. Chambrone L, Sukekava F, Araujo MG et al. Root-coverage procedures for the treatment of localized recession-type defects: a Cochrane systematic review. J Periodontol 2010; 81: 452-478.
4. Kassab MM, Cohen RE. The etiology and prevalence of gingival recession. J Am Dent Assoc 2003; 134: 220-225.
5. Goldstein M, Brayer L, Schwartz Z. A critical evaluation of methods for root coverage. Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7: 87-98.
6. Gartrell JR, Mathews DP. Gingival recession. The condition, process, and treatment. Dent Clin North Am 1976; 20: 199-213.
7. Smith RG. Gingival recession. Reappraisal of an enigmatic condition and a new index for monitoring. J Clin Periodontol 1997; 24: 201-205.
8. Tugnait A, Clerehugh V. Gingival recession-its significance and management. J Dent 2001; 29: 381-394.
9. Alkan A, Keskiner I, Yuzbasioglu E. Connective tissue grafting on resin ionomer in localized gingival recession. J Periodontol 2006; 77: 1446-1451.

10. Goldstein M, Nasatzky E, Goultschin J, Boyan BD, Schwartz Z. Coverage of previously carious roots is as predictable a procedure as coverage of intact roots. *J Periodontol* 2002; 73: 1419-1426.
11. Zucchelli G, Amore C, Sforza NM, Montebugnoli L, De Sanctis M. Bilaminar techniques for the treatment of recession-type defects. A comparative clinical study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 862-870.
12. Kim DM. Periodontal plastic surgery procedures reduce localized gingival recession defects. *J Am Dent Assoc* 2011; 142: 850-851.
13. Langer B, Calagna LJ. The subepithelial connective tissue graft. A new approach to the enhancement of anterior cosmetics. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1982; 2: 22-33.
14. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 1985; 56: 715-720.
15. Allen AL. Use of the suprapariosteal envelope in soft tissue grafting for root coverage. II. Clinical results. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14: 302-315.
16. Allen AL. Use of the suprapariosteal envelope in soft tissue grafting for root coverage. I. Rationale and technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14: 216-227.
17. Blanes RJ, Allen EP. The bilateral pedicle flap-tunnel technique: a new approach to cover connective tissue grafts. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999; 19: 471-479.
18. Bruno JF. Connective tissue graft technique assuring wide root coverage. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14: 126-137.
19. Harris RJ. The connective tissue and partial thickness double pedicle graft: a predictable method of obtaining root coverage. *J Periodontol* 1992; 63: 477-486.
20. Nelson SW. The subpedicle connective tissue graft. A bilaminar reconstructive procedure for the coverage of denuded root surfaces. *J Periodontol* 1987; 58: 95-102.
21. Oliver MJ. Multiple denuded root surfaces. Complete coverage with a one-stage, subepithelial connective tissue graft. *Oral Health* 1987; 77: 51-58.
22. Raetzke PB. Covering localized areas of root exposure employing the "envelope" technique. *J Periodontol* 1985; 56: 397-402.

23. Hart TC, Hart PS, Bowden DW, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *J Med Genet* 1999; 36: 881-887.
24. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
25. Fiorellini JP, Kim, D. M., Ishikawa S. o. (ed). *The Gingiva*. missouri: Elsevier, 2006.
26. Saczko J, Dominiak M, Kulbacka J, Chwilkowska A, Krawczykowska H. A simple and established method of tissue culture of human gingival fibroblasts for gingival augmentation. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 117-119.
27. Dominiak M, Lysiak-Drwal K, Saczko J, Kunert-Keil C, Gedrange T. The clinical efficacy of primary culture of human fibroblasts in gingival augmentation procedures-a preliminary report. *Ann Anat* 2012; 194: 502-507.
28. Acar G. Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü Kaynaklı Yeni Tedavi Seçenekleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2007; 38: 32 - 39.
29. Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: a case series. *J Periodontol* 2003; 74: 262-267.
30. Mohammadi M, Shokrgozar MA, Mofid R. Culture of human gingival fibroblasts on a biodegradable scaffold and evaluation of its effect on attached gingiva: a randomized, controlled pilot study. *J Periodontol* 2007; 78: 1897-1903.
31. McGuire MK, Scheyer ET, Nunn ME, Lavin PT. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol* 2008; 79: 1847-1856.
32. Wilson TG, Jr., McGuire MK, Nunn ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. II. Comparison to the subepithelial connective tissue graft: a randomized controlled feasibility study. *J Periodontol* 2005; 76: 881-889.
33. McGuire MK, Nunn ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. *J Periodontol* 2005; 76: 867-880.

34. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, et al. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: a proof-of-concept study. *J Periodontol* 2010; 81: 616-625.
35. Lotfi G, Shokrgozar MA, Mofid R et al. A clinical and histologic evaluation of gingival fibroblasts seeding on a chitosan-based scaffold and its effect on the width of keratinized gingiva in dogs. *J Periodontol* 2011; 82: 1367-1375.
36. Dohan DM, Choukroun J, Diss A et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2006; 101: e37-44.
37. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* 2009; 27: 63-69.
38. Toffler M TN, Holtzclaw D, Corso MD, Dohan DM. Introducing Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. *J Implant Adv Clin Dent* 2009; 1: 22-31.
39. Gassling V, Douglas T, Warnke PH et al. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clinical oral implants research* 2010; 21: 543-549.
40. Gassling V, Hedderich J, Acil Y, et al. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24: 320-328.
41. Newman M, Takei, H. ve Carranza, F. A. Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. *Clinical Periodontology* 2002: 64-73.
42. Takei H, Azzi R, Han J. Periodontal plastic and esthetic surgery. In: Carranza FA, ed. *Carranza's Clinical Periodontology*, 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006: 1005.
43. Friedman N. mucogingival surgery. *Texas Dent J* 1957; 75: 358.
44. Periodontology AAP. Proocedings of the World Workshop in periodontics. In *Annals of Periodontology*. Chicago: The academy, 1996.
45. Periodontology AAP. Glossary of periodontal terms.4.ed. Chicago, 2001.

46. Wennstrom J. The C-POST system. *Compend Contin Educ Dent Suppl* 1996; 80-85.
47. Maynard JG, Jr., Wilson RD. Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. *J Periodontol* 1979; 50: 170-174.
48. Periodontology AAP. Consensus report. Mucogingival therapy. *Ann Periodontol* 1996; 1: 702-706.
49. Pini Prato G, Baccetti T, Giorgetti R, Agudio G, Cortellini P. Mucogingival interceptive surgery of buccally-erupted premolars in patients scheduled for orthodontic treatment. II. Surgically treated versus nonsurgically treated cases. *J Periodontol* 2000; 71: 182-187.
50. Ariaudo AA. Problems in treating a denuded labial root surface of a lower incisor. *J Periodontol* 1966; 37: 274-278.
51. Sullivan HC, Atkins JH. Free autogenous gingival grafts. 3. Utilization of grafts in the treatment of gingival recession. *Periodontics* 1968; 6: 152-160.
52. Mlinek A, Smukler H, Buchner A. The use of free gingival grafts for the coverage of denuded roots. *J Periodontol* 1973; 44: 248-254.
53. Miller PD, Jr. A classification of marginal tissue recession. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1985; 5: 8-13.
54. Nordland WP, Tarnow DP. A classification system for loss of papillary height. *J Periodontol* 1998; 69: 1124-1126.
55. Hall WB. Present status of soft tissue grafting. *J Periodontol* 1977; 48: 587-597.
56. Ericsson I, Lindhe J. Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 95-103.
57. Lang NP, Loe H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. *J Periodontol* 1972; 43: 623-627.
58. Tenenbaum H. A clinical study comparing the width of attached gingiva and the prevalence of gingival recessions. *J Clin Periodontol* 1982; 9: 86-92.
59. Dorfman HS, Kennedy JE, Bird WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 316-324.
60. Freedman AL, Salkin LM, Stein MD, Green K. A 10-year longitudinal study of untreated mucogingival defects. *J Periodontol* 1992; 63: 71-72.
61. Kisch J, Badersten A, Egelberg J. Longitudinal observation of "unattached," mobile gingival areas. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 131-134.

62. Miyasato M, Crigger M, Egelberg J. Gingival condition in areas of minimal and appreciable width of keratinized gingiva. *J Clin Periodontol* 1977; 4: 200-209.
63. Wennstrom JL. Lack of association between width of attached gingiva and development of soft tissue recession. A 5-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 181-184.
64. Prato GP, Clauser C, Cortellini P. Periodontal plastic and mucogingival surgery. *Periodontol 2000* 1995; 9: 90-105.
65. Bohanman H.M. Studies in the alteration of vestibular depth. III. Vestibular incision. *J Periodontol* 1963; 34: 209-215.
66. Miller PD, Jr. Regenerative and reconstructive periodontal plastic surgery. Mucogingival surgery. *Dent Clin North Am* 1988; 32: 287-306
67. Geier AM. Mucogingival problems and the movement of mandibular incisors: a clinical review. *Am J Orthod* 1980; 78: 511-527.
68. Watson PJ. Gingival recession. *J Dent* 1984; 12: 29-35.
69. Alldritt WA. Abnormal gingival form. *Proc R Soc Med* 1968; 61: 137-142.
70. Lost C. Depth of alveolar bone dehiscences in relation to gingival recessions. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 583-589.
71. Olsson M, Lindhe J. Periodontal characteristics in individuals with varying form of the upper central incisors. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 78-82
72. Wennstrom JL, Lindhe J, Sinclair F, Thilander B. Some periodontal tissue reactions to orthodontic tooth movement in monkeys. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 121-129.
73. Mirko P, Miroslav S, Lubor M. Significance of the labial frenum attachment in periodontal disease in man. Part II. An attempt to determine the resistance of periodontium. *J Periodontol* 1974; 45: 895-897
74. Powell RN, McEniery TM. Disparities in gingival height in the mandibular central incisor region of children aged 6--12 years. *Community Dent Oral Epidemiol* 1981; 9: 32-36.
75. Trott JR, Love B. An analysis of localized gingival recession in 766 Winnipeg High School students. *Dent Pract Dent Rec* 1966; 16: 209-213
76. Rawal SY, Claman LJ, Kalmar JR, Tatakis DN. Traumatic lesions of the gingiva: a case series. *J Periodontol* 2004; 75: 762-769.

77. Aytepe E, Aydogmus Z. Hastaların kendi kendilerine oluşturdıkları diseti lezyonları ve bir olgu bildirisi. Dishekimliğinde Klinik 1991; 2: 73-75.
78. Campbell A, Moore A, Williams E, Stephens J, Tatakis DN. Tongue piercing: impact of time and barbell stem length on lingual gingival recession and tooth chipping. J Periodontol 2002; 73: 289-297.
79. Dibart S, De Feo P, Surabian G, et al. Oral piercing and gingival recession: review of the literature and a case report. Quintessence Int 2002; 33: 110-112.
80. Sardella A, Pedrinazzi M, Bez C, Lodi G, Carrassi A. Labial piercing resulting in gingival recession. A case series. J Clin Periodontol 2002; 29: 961-963.
81. Serino G, Wennstrom JL, Lindhe J, Eneroth L. The prevalence and distribution of gingival recession in subjects with a high standard of oral hygiene. J Clin Periodontol 1994; 21: 57-63.
82. Joshipura KJ, Kent RL, DePaola PF. Gingival recession: intra-oral distribution and associated factors. J Periodontol 1994; 65: 864-871.
83. Niemi ML, Sandholm L, Ainamo J. Frequency of gingival lesions after standardized brushing as related to stiffness of toothbrush and abrasiveness of dentifrice. J Clin Periodontol 1984; 11: 254-261.
84. Breitenmoser J, Mormann W, Muhlemann HR. Damaging effects of toothbrush bristle end form on gingiva. J Periodontol 1979; 50: 212-216.
85. Danser MM, Timmerman MF, Y IJ, Bulthuis H, van der Velden U, van der Weijden GA. Evaluation of the incidence of gingival abrasion as a result of toothbrushing. J Clin Periodontol 1998; 25: 701-706.
86. Rajapakse PS, McCracken GI, Gwynnett E, et al. Does tooth brushing influence the development and progression of non-inflammatory gingival recession? A systematic review. J Clin Periodontol 2007; 34: 1046-1061.
87. Wennstrom JL. Mucogingival therapy. Ann Periodontol 1996; 1: 671-701.
88. El Haddad SA AERM, El Shall M. Use of pedicled buccal fat pad in root coverage of severe gingival recession defect. J Periodontol 2008; 79: 1271-1279
89. Hangorsky U, Bissada NF. Clinical assessment of free gingival graft effectiveness on the maintenance of periodontal health. J Periodontol 1980; 51: 274-278.
90. Donaldson D. Gingival recession associated with temporary crowns. J Periodontol 1973; 44: 691-696.

91. Koke U, Sander C, Heinecke A, Muller HP. A possible influence of gingival dimensions on attachment loss and gingival recession following placement of artificial crowns. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23: 439-445.
92. Kosyfaki P, del Pilar Pinilla Martin M, Strub JR. Relationship between crowns and the periodontium: a literature update. *Quintessence Int* 2010; 41: 109-126.
93. Padbury A, Jr., Eber R, Wang HL. Interactions between the gingiva and the margin of restorations. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 379-385.
94. Albandar JM, Kingman A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999; 70: 30-43.
95. Gorman WJ. Prevalence and etiology of gingival recession. *J Periodontol* 1967; 38: 316-322.
96. Murray JJ. Gingival recession in tooth types in high fluoride and low fluoride areas. *J Periodontal Res* 1973; 8: 243-251.
97. Addy M. Etiology and clinical implications of dentine hypersensitivity. *Dent Clin North Am* 1990; 34: 503-514.
98. West NX, Hughes JA, Addy M. Dentine hypersensitivity: the effects of brushing toothpaste on etched and unetched dentine in vitro. *J Oral Rehabil* 2002; 29: 167-174.
99. Dowell P, Addy M, Dummer P. Dentine hypersensitivity: aetiology, differential diagnosis and management. *Br Dent J* 1985; 158: 92-96.
100. Rimondini L, Baroni C, Carrassi A. Ultrastructure of hypersensitive and non-sensitive dentine. A study on replica models. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 899-902.
101. Bozok Y. Dentin Hassasiyeti Tedavisinde Diş Hekimi Tarafından Uygulanan Desensitize Edici Ajanlar. *ADO Klinik Bilimler Dergisi* 2011; 5: 867-874
102. Orchardson R, Gillam DG. Managing dentin hypersensitivity. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 990-998; quiz 1028-1029.
103. Orsini M, Orsini G, Benlloch D, et al. Esthetic and dimensional evaluation of free connective tissue grafts in prosthetically treated patients: a 1-year clinical study. *J Periodontol* 2004; 75: 470-477.

104. Hanson CL, De Guire MJ, Schinkel AM, et al. Self-care behaviors in insulin-dependent diabetes: evaluative tools and their associations with glycemic control. *J Pediatr Psychol* 1996; 21: 467-482.
105. Sasanaluckit P, Albustany KR, Doherty PJ, Williams DF. Biocompatibility of glass ionomer cements. *Biomaterials* 1993; 14: 906-916.
106. Van der VU AF. Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol*, 1984; 11: 281-284.
107. Grupe HE WR. Repair of gingival defects by sliding flap operation. *J Periodontol* 1956; 27: 92-95.
108. Guinard EA, Caffesse RG. Treatment of localized gingival recessions. Part I. Lateral sliding flap. *J Periodontol* 1978; 49: 351-356.
109. Lucchesi JA, Santos VR, Amaral CM, Peruzzo DC, Duarte PM. Coronally positioned flap for treatment of restored root surfaces: a 6-month clinical evaluation. *J Periodontol*. 2007 Apr; 78(4): 615-23.
110. Cohen DW, Ross SE. The double papillae repositioned flap in periodontal therapy. *J Periodontol* 1968; 39: 65-70.
111. Gapski R, Parks CA, Wang HL. Acellular dermal matrix for mucogingival surgery: a meta-analysis. *J Periodontol* 2005; 76: 1814-1822.
112. Bouchard P, Malet J, Borghetti A. Decision-making in aesthetics: root coverage revisited. *Periodontol* 2000 2001; 27: 97-120.
113. Irwin RK. Combined use of the gingival graft and rotated pedicle procedures: case reports. *J Periodontol* 1977; 48: 38-40.
114. Tinti C VG. The treatment of gingival recession with guided tissue regeneration procedure by means of Gore-Tex membranes. *Quintessence Int*, 1990; 6: 465-468.
115. Gottlow J, Laurell L, Teiwik A, Genon P. Guided tissue regeneration using a bioresorbable matrix barrier. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1994; 6: 71-78; quiz 80.
116. Trombelli L, Schincaglia G, Checchi L, Calura G. Combined guided tissue regeneration, root conditioning, and fibrin-fibronectin system application in the treatment of gingival recession. A 15-case report. *J Periodontol* 1994; 65: 796-803.

117. Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 658-668.
118. Cheung WS, Griffin TJ. A comparative study of root coverage with connective tissue and platelet concentrate grafts: 8-month results. *J Periodontol* 2004; 75: 1678-1687.
119. Langer B, Calagna L. The subepithelial connective tissue graft. *J Prosthet Dent* 1980; 44: 363-367.
120. Prato GP, Clauser C, Cortellini P. Guided tissue regeneration and a free gingival graft for the management of buccal recession: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993; 13: 486-493.
121. Common J, McFall WT, Jr. The effects of citric acid on attachment of laterally positioned flaps. *J Periodontol* 1983; 54: 9-18.
122. Garg AK, Gargnese D, Peace I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dent Implantol Update* 2000; 11: 41-44.
123. Dodge JR, Greenwell H, Drisko C, et al. Improved bone regeneration and root coverage using a resorbable membrane with physically assisted cell migration and DFDBA. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 398-411.
124. Henderson RD, Drisko CH, Greenwell H. Root coverage using Alloderm acellular dermal graft material. *J Contemp Dent Pract* 1999; 1: 24-30.
125. Harris RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. *J Periodontol* 1998; 69: 1305-1311.
126. Wei PC, Laurell L, Lingen MW, Geivellis M. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 2. A histological comparative study. *J Periodontol* 2002; 73: 257-265.
127. Henderson RD, Greenwell H, Drisko C et al. Predictable multiple site root coverage using an acellular dermal matrix allograft. *J Periodontol* 2001; 72: 571-582.
128. Harris RJ. A comparative study of root coverage obtained with an acellular dermal matrix versus a connective tissue graft: results of 107 recession defects in 50 consecutively treated patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 51-59.

129. Harris RJ. A short-term and long-term comparison of root coverage with an acellular dermal matrix and a subepithelial graft. *J Periodontol* 2004; 75: 734-743.
130. Paolantonio M, Dolci M, Esposito P et al. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *J Periodontol* 2002; 73: 1299-1307.
131. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil* 2009; 36: 368-389.
132. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2: 187-208.
133. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987: 7-16.
134. Gümüşderelioğlu M. Doku Mühendisliği. *Bilim ve Teknik Dergisi*. 1993; 26: 307,465-466.
135. Papillon MM LP. Two cases of symmetrically familial palmar plantar hyperkeratosis (Meleda disease) within brother and sister combined with severe dental alterations in both cases (in French). *Bull Soc Fr Dermatol Syphilis* 1924: 31: 82-37.
136. Hubbell J PB. Tissue Engineering. Eds. Branzino D. Joseph, CRC Press, The Biomedical Engineering Handbook Second Edition, Chapter 109. 2000: 1533-1545
137. Hattab FN, Amin WM. Papillon-Lefevre syndrome with albinism: a review of the literature and report of 2 brothers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 709-716
138. Aydın AK, Berbercan P. Biyomühendislik esasları ile diş oluşturulmasına yönelik yaklaşımlar. *SÜ Dişhek Fak Derg* 2010: 99-114.
139. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006; 3: 589-601.
140. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4: 743-765.
141. Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003; 113: 25-32.

142. Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 1674-1678.
143. Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E et al. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng* 2004; 10: 537-544.
144. Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1027-1036.
145. Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 411-418.
146. Rice MA, Dodson BT, Arthur JA, Anseth KS. Cell-based therapies and tissue engineering. *Otolaryngol Clin North Am* 2005; 38: 199-214, v.
147. Becker W, Becker BE. Periodontal regeneration updated. *J Am Dent Assoc* 1993; 124: 37-43.
148. Rice MA, Anseth KS. Encapsulating chondrocytes in copolymer gels: bimodal degradation kinetics influence cell phenotype and extracellular matrix development. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70: 560-568.
149. Bryant SJ, Anseth KS. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64: 70-79.
150. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-1014.
151. Baysal K. Biyobozunur Biyopolimerler. *Bilim ve Teknik Dergisi* 2004; 16-18.
152. Omstead DR, Baird LG, Christenson L, Du Moulin G, Tubo R, Maxted DD, et al. Voluntary guidance for the development of tissue-engineered products. *Tissue Eng* 1998; 4: 239-266.
153. Jin QM, Zhao M, Webb SA et al. Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 54-60.
154. Kim BS, Nikolovski J, Bonadio J, Smiley E, Mooney DJ. Engineered smooth muscle tissues: regulating cell phenotype with the scaffold. *Exp Cell Res* 1999; 251: 318-328.
155. Vacanti CA, Kim W, Upton J, et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 1993; 25: 1019-1021.

156. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, et al. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997; 63: 1059-1069.
157. Laurencin CT, El-Amin SF, Ibim SE et al. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1996; 30: 133-138.
158. Gorna K, Gogolewski S. Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 813-827.
159. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26: 5158-5166.
160. Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2004; 68: 773-782.
161. Payne RG, McGonigle JS, Yaszemski MJ, Yasko AW, Mikos AG. Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 3. Proliferation and differentiation of encapsulated marrow stromal osteoblasts cultured on crosslinking poly(propylene fumarate). *Biomaterials* 2002; 23: 4381-4387.
162. Marques AP, Cruz HR, Coutinho OP, Reis RL. Effect of starch-based biomaterials on the in vitro proliferation and viability of osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16: 833-842.
163. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80: 2025-2029.
164. Xu WP, Zhang W, Asrican R, et al. Accurately shaped tooth bud cell-derived mineralized tissue formation on silk scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 549-557.
165. Ducheyne P, el-Ghannam A, Shapiro I. Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone-like tissue. *J Cell Biochem* 1994; 56: 162-167.

166. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 1563-1570.
167. Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials* 1998; 19: 1935-1943.
168. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65: 456-462.
169. Tyagi P, Dhindsa MK. Tissue engineering and its implications in dentistry. *Indian J Dent Res* 2009; 20: 222-226.
170. Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475-480.
171. Dunn CA, Jin Q, Taba M, Jr., et al. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Mol Ther* 2005; 11: 294-299.
172. Anderson DM, Hall LL, Ayyalapu AR et al. Stability of mRNA/cationic lipid lipoplexes in human and rat cerebrospinal fluid: methods and evidence for nonviral mRNA gene delivery to the central nervous system. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 191-202.
173. Nabel GJ. Development of optimized vectors for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 324-326.
174. Myers JN. The use of biological therapy in cancer of the head and neck. *Curr Prob Cancer* 1999; 23: 106-134.
175. Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 551-554.
176. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
177. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 1999; 19: 40-58.
178. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 230-247.
179. Baum BJ, Mooney DJ. The impact of tissue engineering on dentistry. *J Am Dent Assoc* 2000; 131: 309-318.

180. Tamura RN, Oda D, Quaranta V, et al. Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants. *J Periodontal Res* 1997; 32: 287-294.
181. Heijl L, Heden G, Svardstrom G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 705-714.
182. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release* 2000; 64: 91-102.
183. Polson AM. Periodontal regeneration. Chicago: Quintessence Publishing 1994: 137- 150.
184. Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995; 1: 3-13.
185. Garlick JA, Fenjves ES. Keratinocyte gene transfer and gene therapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 204-221.
186. Mizuno H, Hata K, Kojima K, et al. A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng* 2006; 12: 1227-1335.
187. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res* 2008; 87: 767-771.
188. Chen F, Ouyang H, Feng X et al. Anchoring dental implant in tissue-engineered bone using composite scaffold: a preliminary study in nude mouse model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 586-591.
189. Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21: 141-147.
190. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 579-586.

191. Sauerbier S, Stricker A, Kuschnierz J, et al. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16: 215-223.
192. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 589-597.
193. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004; 10: 955-964.
194. Xu HH, Zhao L, Weir MD. Stem cell-calcium phosphate constructs for bone engineering. *J Dent Res* 2010; 89: 1482-1488.
195. Marei MK, Nouh SR, Saad MM, Ismail NS. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. *Tissue Eng* 2005; 11: 751-767.
196. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittering M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2003; 31: 34-39.
197. Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC et al. Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 69-73.
198. Jin X, Zhongguo XF, Chong J W , Zhi Z. Recent progress of researches in cartilage tissue engineering. 2011; 25: 187-192.
199. Xie HT, Wang GJ, Sun JG, et al. High performance liquid chromatographic-mass spectrometric determination of ginsenoside Rg3 and its metabolites in rat plasma using solid-phase extraction for pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 818: 167-173.
200. Kagami H, Wang S, Hai B. Restoring the function of salivary glands. *Oral Dis* 2008; 14: 15-24.
201. Pena I, Junquera LM, Meana A, et al. In vivo behavior of complete human oral mucosa equivalents: characterization in athymic mice. *J Periodontal Res* 2011; 46: 214-220.
202. Bayar GR, Gulses A. Ex-vivo production of oral mucosa keratinocytes by the direct explant method. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013; 42: 417-418.

203. Maia LP, Novaes AB, Jr., Souza SL, et al. In vitro evaluation of acellular dermal matrix as a three-dimensional scaffold for gingival fibroblasts seeding. *J Periodontol* 2011; 82: 293-301.
204. Berahim Z, Moharamzadeh K, Rawlinson A, Jowett AK. Biologic interaction of three-dimensional periodontal fibroblast spheroids with collagen-based and synthetic membranes. *J Periodontol* 2011; 82: 790-797.
205. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, et al. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 443-449.
206. Köseoglu S, Duran I, Saglam M, et al. Efficacy of collagen membrane seeded with autologous gingival fibroblasts in gingival recession treatment: a randomized, controlled pilot study. *J Periodontol* 2013; 84: 1416-1424.
207. Raja SV NM. Platelet-rich fibrin: evolution of a second generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res* 2008; 19: 42-46.
208. Dohan Ehrenfest DM RL, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) *Trends Biotechnol* 2009; 27: 158-167.
209. Jameson CA. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. *Lab Med* 2007; 38: 39-42.
210. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2004; 62: 489-496.
211. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP. *Implant dentistry* 2001; 10: 225-228.
212. Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *European cells & materials* 2010; 20: 13-23.
213. Saluja H, Dehane V, Mahindra U. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Annals of maxillofacial surgery* 2011; 1: 53-57.
214. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of periodontology* 2010; 81: 546-555.

215. Kumar RV, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration. *Cell Tissue Bank* 2013; 14: 453-463.
216. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2006; 101: e45-50.
217. Carlson NE, Roach RB, Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *Journal of the American Dental Association* 2002; 133: 1383-1386.
218. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1998; 85: 638-646.
219. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2006; 101: e51-55.
220. Kishimoto T AS, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. *Blood* 1995; 86: 1243-1254.
221. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, et al. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9035-9039.
222. Goldsby RA KT, Osborne BA, Kuby J. Cytokines. In: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J (eds) *Immunology*, 5th edn W H Freeman & Company, New York 2003; pp: 276-298.
223. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83: 113-118.
224. Grando M L, Westphalen BL, de Figueiredo JA, et al. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *Journal of endodontics* 2007; 33: 524-530.
225. Louise P. Platelet-rich fibrin in human acute wound models. PhD Thesis, University of Copenhagen 2008.
226. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral*

- surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 2006; 101: e56-60.
227. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 936: 355-367.
 228. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2006; 101: 299-303.
 229. Del Corso M TM, Dohan Ehrenfest DM. Use of an autologous leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) membrane in post-avulsion sites: an overview of Choukroun's PRF *J Implant Adv Clin Dent* 2010; 1: 27-35.
 230. Zhao JH, Chang YC. Management of radicular cysts using platelet-rich fibrin and bioactive glass: a report of two cases. *J Formos Med Assoc* 2012; doi: 10.1016/j.jfma.2011.09.027.
 231. Simon BI, Gupta P, Tajbakhsh S. Quantitative evaluation of extraction socket healing following the use of autologous platelet-rich fibrin matrix in humans. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2011; 31: 285-295.
 232. Chang YC, Zhao JH. Clinical application of platelet-rich fibrin as the sole grafting material in periodontal intrabony defects. *J Dent Sci* 2011; 6: 181-188.
 233. Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M et al. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *Journal of periodontology* 2009; 80: 2056-2064.
 234. Sharma A, Pradeep AR. Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2011; 82: 1705-1712.
 235. Sharma A, Pradeep AR. Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized clinical trial. *Journal of periodontology* 2011; 82: 1396-1403.
 236. Pradeep AR, Rao NS, Agarwal E, et al. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony

- defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2012; 83: 1499-1507.
237. Anilkumar K, Geetha A, Umasudhakar et al. Platelet-rich-fibrin: A novel root coverage approach. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2009; 13: 50-54.
 238. Aroca S, Keglevich T, Barbieri B, Gera I, Etienne D. Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a 6-month study. *Journal of periodontology* 2009; 80: 244-252.
 239. Saadoun AP. Current trends in gingival recession coverage--Part II: Enamel matrix derivative and platelet-rich plasma. *Pract Proced Aesthet Dent* 2006; 18: 521-526; quiz 528.
 240. Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, et al. Use of platelet-rich fibrin membrane following treatment of gingival recession: a randomized clinical trial. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012; 32: e41-50.
 241. Eren G, Atilla G. Platelet-Rich Fibrin in the Treatment of Bilateral Gingival Recessions. *jperiodontology* 2012; 2; 154-160.
 242. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 56-61.
 243. Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier JB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 185-194.
 244. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, et al. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 341-352.
 245. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009; 108: 707-713.

246. Tsai CH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cell in vitro. *J Dent Sci* 2009; 4: 130-135.
247. Wu CL, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aus Dent J* 2012; 57: 207-212.
248. Kang YH, Jeon SH, Park JY, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue engineering Part A* 2011; 17: 349-359.
249. Chang IC, Tsai CH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *Journal of biomedical materials research Part A* 2010; 95: 327-332.
250. Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Australian dental journal* 2011; 56: 365-371.
251. Simain-Sato F, Lahmouzi J, Heinen E, Defresne MP, De Pauw-Gillet MC, Grisar T, et al. Graft of autologous fibroblasts in gingival tissue in vivo after culture in vitro. Preliminary study on rats. *J Periodontal Res* 1999; 34: 323-328.
252. Simain-Sato F, Lahmouzi J, Kalykakis GK et al. Culture of gingival fibroblasts on bioabsorbable regenerative materials in vitro. *J Periodontol* 1999; 70: 1234-1239.
253. Lütfoğlu M. Periodontal rejenerasyon ve büyüme faktörleri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Dergisi* 2007; 17: 35-43.
254. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J* 2008; 53: 108-121.
255. Liu J, Zhang Y, Bai L, Cui X, Zhu J. Rat bone marrow mesenchymal stem cells undergo malignant transformation via indirect co-cultured with tumour cells. *Cell Biochem Funct* 2012; 30: 650-656.
256. Tsai C H, Shen S,Y, Zhao J,H, Chang Y,C. Platelet rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *J Dent Sci* 2009; 4: 130-135.
257. Wu CL, Lee SS,Tsai C,H.,Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal* 2012; 57: 207-212.

258. Huang FM, Yang SF, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2010; 36: 1628-1632.
259. Acar G. Doku mühendisliği ve hücre kültürü kaynaklı yeni tedavi seçenekleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2007; 38: 32-39.
260. Fritz ME. Implant therapy II. *Ann Periodontol* 1996; 1: 796-815.
261. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* 2001; 72: 215-229.
262. Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, Ville G, Hartmann DJ. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 1203-1208.
263. Schrieber R, Seybold U. Gelatine production, the six steps to maximum safety. *Dev Biol Stand* 1993; 80: 195-198.
264. Yang C, Hillas PJ, Baez JA, et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 2004; 18: 103-119.
265. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 871-875.
266. Locci P, Calvitti M, Belcastro S, et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1997; 68: 857-863.
267. Gorodetsky R, Vexler A, An J, Mou X, Marx G. Haptotactic and growth stimulatory effects of fibrin(ogen) and thrombin on cultured fibroblasts. *J Lab Clin Med* 1998; 131: 269-280.
268. Sporn LA, Bunce LA, Francis CW. Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage. *Blood* 1995; 86: 1802-1810.
269. Huang Q, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng* 2002; 8: 469-482.
270. Catelas I, Sese N, Wu BM, et al. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 2006; 12: 2385-2396.

271. Trombi L, D'Alessandro D, Pacini S, et al. Good manufacturing practice-grade fibrin gel is useful as a scaffold for human mesenchymal stromal cells and supports in vitro osteogenic differentiation. *Transfusion* 2008; 48: 2246-2251.
272. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, et al. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24: 2497-2502.
273. Perka C, Arnold U, Spitzer RS, Lindenhayn K. The use of fibrin beads for tissue engineering and subsequential transplantation. *Tissue Eng* 2001; 7: 359-361.
274. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-228.
275. Tsay RC, Vo J, Burke A, et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 521-528.
276. Samandari MH, Yaghmaei M, Ejlali M, Moshref M, Saffar AS. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 574-578.
277. Rinastiti M, Harijadi, Santoso AL, Sosroseno W. Histological evaluation of rabbit gingival wound healing transplanted with human amniotic membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35: 247-251.
278. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 106-116.
279. AmemiyaT NT, Oseko F, Yamamoto T, Fukushima A. Human oral epithelial and periodontal sheets cultured on human amniotic membrane for oral reconstruction. *j oral tissue engin* 2004; 1: 89-96.
280. Ahn KM, Lee JH, Hwang SJ, et al. Fabrication of myomucosal flap using tissue-engineered bioartificial mucosa constructed with oral keratinocytes cultured on amniotic membrane. *Artif Organs* 2006; 30: 411-423.
281. Baum J. Thygeson lecture. Amniotic membrane transplantation: why is it effective? *Cornea* 2002; 21: 339-341.
282. Bilir A, Aybar B, Tanrikulu SH, Issever H, Tuna S. Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 46-52.
283. Hakki SS, Korkusuz P, Purali N, et al. Periodontal ligament cell behavior on different titanium surfaces. *Acta Odontol Scand* 2012.

284. Hakki SS, Bozkurt SB. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 325-331.
285. Yamada K, Yamaura J, Katoh M, et al. Fabrication of cultured oral gingiva by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol* 2006; 77: 672-677.
286. McGuire MK, Scheyer ET. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to determine the safety and efficacy of cultured and expanded autologous fibroblast injections for the treatment of interdental papillary insufficiency associated with the papilla priming procedure. *J Periodontol* 2007; 78: 4-17.
287. Kurien T, Deo V, Bhati A. The pouch and tunnel technique for the management of adjacent gingival recession defects: surgical correction and one-year follow-up. *J Contemp Dent Pract* 2010; 11: 041-048.
288. Trylovich DJ, Cobb CM, Pippin DJ, Spencer P, Killoy WJ. The effects of the Nd: YAG laser on in vitro fibroblast attachment to endotoxin-treated root surfaces. *J Periodontol* 1992; 63: 626-632.
289. Hojo M, Inokuchi S, Kidokoro M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 1638-1645.

EKLER

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Dişeti çekilmelerinin tedavisinde uygulanan ve hasta konforunu belli bir süre azaltan işlemler yerine hastanın canını daha az acıtan ve daha kolay kabul edilebilen yöntemler araştırılmaktadır. Araştırmamızda bu amaçla dişeti çekilmelerinin tedavisinde kullanılabilecek farklı materyallerin birbirleriyle karşılaştırmaları yapılacaktır. Bu laboratuvar çalışması için mümkün en olan temiz şartlarda, mikrop bulaşma ihtimalinin en düşük olduğu ortamda, uyuşturulacak olan 20 yaş dişinizin çekimi sırasında diş ile birlikte gelen atık dişeti dokunuzdan ufak bir parça ayrılıp uygun laboratuvar koşullarında dişeti hücreleriniz alınacaktır. Bu hücreler 1 hafta sonra sizden tek sefer için alacağımız 10 ml kandan elde ettiğimiz zar üzerinde ve sıgır kaynaklı bir zar üzerinde konumlandırılıp, hücrelerin çoğalması izlenecektir. Elde edilen örneklerden ince parçalar alınıp mikroskop altında incelenecektir. Sizden elde ettiğimiz kayıtların gizliliği çalışma yöneticisi ve yardımcısının sorumluluğunda olmak kaydıyla çalışmamızda kullanılacaktır.

Yukarıdaki metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullar altında bu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı Soyadı, Adresi ve Telefonu:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı ve İmzası: Melike Kolay

Telefonu: 0532 6859149

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Plateletten Zengin Fibrin ve Kollajen Membran Üzerinde İnsan Dişeti Fibroblastlarının Kültüre Edilişi ve Histolojik Değerlendirmesi			
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
EUDRACT NUMARASI				
SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Banu Arzu Balkan			
SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Periodontoloji			
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI				
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı			
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı			
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu			
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZM. TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	DR. TEZİ ☒	Y.LİSANS TEZİ ☐
ARAŞTIRMA FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1			
	FAZ 2			
	FAZ 3			
	FAZ 4			
	BE/BY			
	DİĞER			
İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	☐	Diğer ise belirtiniz		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI	Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
SİGORTA	☐
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐
İLAN	☐
YILLIK BİLDİRİM	☐
SONUÇ RAPORU	☐
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐
DİĞER	☐

İSLİM GİRİTİP
Bakım YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2011/111	Karar Tarihi : 01.03.2011
	Erciyes Üniversitesi Tıp Dış Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Banu Arzu Alkan'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI Erciyes Üniversitesi Senatosunun 08.12.2010 tarih ve 16 nolu toplantı kararı

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Prof. Dr. Halit MADENOĞLU	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Prof.Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Doç.Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☐ x ☐ H ☒	
Doç.Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Doç.Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Doç.Dr. Mehmet Güngör KAYA	Kardiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Rektörlük	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Ecz. Nuran YOZGAT	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	E.Ü. Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ x ☐ H ☐	

ASLI GİTİDİ.

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Melike Kolay

Uyruğu: Türkiye(TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 19.02.1982 ADANA

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 352 2076666 / 29150

E-posta: melike_onel@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.D.
KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora:	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji A.D.	2007-halen
Yüksek Lisans:	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi	2000-2006
Lise:	Adana Anadolu Lisesi	1993-2000

Yabancı Dil: İngilizce