

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

**TROMBOSİTTEN ZENGİN VE FAKİR PLAZMANIN
ORTODONTİK DİŞ HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sibel AKBULUT**

**Danışman
Doç. Dr. Ahmet YAĞCI**

Doktora Tezi

**Haziran 2015
KAYSERİ**

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

**TROMBOSİTTEN ZENGİN VE FAKİR PLAZMANIN ORTODONTİK
DİŞ HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sibel AKBULUT**

**Danışman
Doç. Dr. Ahmet YAĞCI**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TDK-2014-4760 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2015
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.

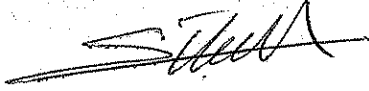
Sibel AKBULUT

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Trombositten Zengin ve Fakir Plazmanın Ortodontik Diş Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

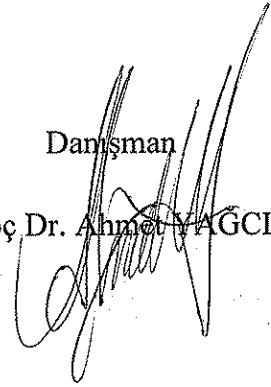
Tezi Hazırlayan

Sibel AKBULUT



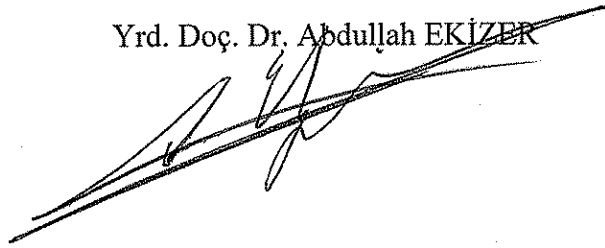
Danışman

Doç Dr. Ahmet YAGCI



Ortodonti ABD Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Abdullah EKİZER

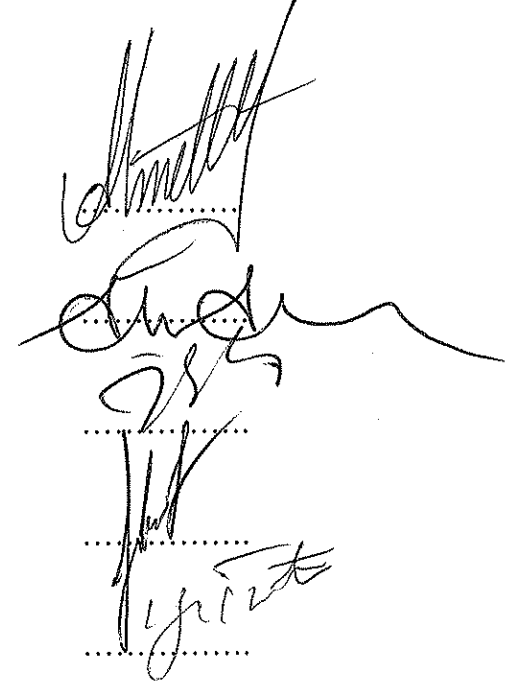


Doç Dr. Ahmet YAĞCI danışmanlığında **Sibel AKBULUT** tarafından hazırlanan **“Trombositte Zengin ve Fakir Plazmanın Ortodontik Diş Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Ortodonti** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

...02.106.12515...

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Ahmet YAĞCI
(Erciyes Üni. Diş Hekimliği Fak. Ortodonti ABD)
Üye : Prof. Dr. Ali Altuğ BIÇAKÇI
(Gaziosmanpaşa Üni. Diş Hekimliği Fak. Ortodonti ABD)
Üye : Prof. Dr. İbrahim YAVUZ
(Erciyes Üni. Diş Hekimliği Fak. Ortodonti ABD)
Üye : Doç. Dr. Gökmen KURT
(Yeni Yüzyıl Üni. Diş Hekimliği Fak. Ortodonti ABD)
Üye : Yrd. Doç. Dr. Yakup ÜSTÜN
(Erciyes Üni. Diş Hekimliği Fak. Endodonti ABD)



ONAY:

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

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

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Zorlu doktora eğitim süreci boyunca bilgi ve tecrübesiyle olduğu kadar iyi niyeti ve samimiyetiyle bana yol gösteren, ayrıca bu tezin hazırlanmasında ve sunumunda emeği geçen sayın hocam Doç. Dr. Ahmet YAĞCI'ya,

Bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşarak iyi bir eğitim almamızı sağlayan ve bu anlamda kendimi kendilerine karşı borçlu hissettiğim çok saygıdeğer hocalarım; yine başta Doç. Dr. Ahmet YAĞCI olmak üzere, Prof. Dr. İbrahim YAVUZ'a, Doç. Dr. Gökmen KURT'a, Doç. Dr. S. İlhan RAMOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Abdullah EKİZER'e, Yrd. Doç. Dr. Nisa GÜL'e, Prof. Dr. Tancan UYSAL'a, Prof. Dr. Metin ORHAN'a ve Prof. Dr. Enis GÜRAY'a

Doktora eğitimimin devam etmesinde vermiş oldukları destek ve hoşgörü nedeni ile sayın hocalarım; Prof. Dr. Ali Altuğ BIÇAKÇI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Feyza HOLOĞLU'na,

Doktora eğitimine başladığım günden bu güne sıcak ve samimi bir ortamda hissetmemi sağlayan, dostluk ve gülümleriyle bana destek olan tüm asistan arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitim sürecinde de bana destek olmak için yaşadıkları şehri terkederek yanımda olan ve bir kez daha büyük bir fedakârlık örneği gösteren canım annem Sultan AYVAZ ve canım babam Nazım AYVAZ'a,

Daima bana duyduğu güven ile beni cesaretlendiren ve manevi desteğini arkamda hissettiğim ağabeyim Serdal AYVAZ'a,

Lisans sonrası eğitime devam etmem konusunda beni teşvik eden ve doktora sürecinde bana destek olan eşim Doç. Dr. Nihat AKBULUT'a,

Geçen sene hayatımıza giren ve varlığıyla bana güç veren oğlum Ali Yiğit AKBULUT'a,

Tüm bana kattıklarından dolayı en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Sibel AKBULUT

Kayseri, Haziran 2015

TROMBOSİTTEN ZENGİN VE FAKİR PLAZMANIN ORTODONTİK DİŞ HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI

Sibel AKBULUT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ortodonti Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Haziran 2015

Danışman: Doç. Dr. Ahmet YAĞCI

KISA ÖZET

Bu çalışmanın amacı TZP ve TFP uygulamaları ile bu plazma fraksiyonları içerisindeki büyüme faktörlerinin ortodontik diş hareketi üzerine olan etkilerini değerlendirmektir. Bu amaçla donör olarak 6 ve deney kısmında 48 adet olmak üzere toplam 54 adet wistar albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Donör sıçanlardan intrakardiyak olarak elde edilen tam kandan uygun prosedürle TZP ve TFP elde edilmiştir. Kalan 48 sıçan ise üç gruba ayrılmış ve 14 gün boyunca tüm gruplardaki üst sağ 1. molar ve kesici dişler arasında 50 gr kuvvet uygulayacak kapalı sarmal yaylar uygulanarak, deneysel ortodontik diş hareketi oluşturulmuştur. Deney grubundaki 1. grup sıçanlara herhangi bir enjeksiyon yapılmamıştır. 2. grup sıçanlara her iki taraf üst 1. molar dişlerin bukkalinden submukozal olarak 0,1 ml TFP, 3. grup sıçanlara da 0,1 ml TZP enjeksiyonu, sadece aparey uygulandığı gün tek doz olacak şekilde uygulanmıştır. Her üç grupta da maksiller 1. molar- kesici diş arasındaki mesafe, aparey uygulanmadan önce ve sakrifikasyon sonrası ölçülerek, ortodontik diş hareket miktarı tespit edilmiştir. Ayrıca 1, 3, 7 ve 14. günlerde sakrifiye edilen sıçanların üst 1. molar diş distal kök mezial ve distal PDL bölgeleri aktif osteoblast, osteoklast sayısı ile mezial-distal PDL mesafesi bakımından histolojik olarak incelenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, TZP grubunda 3 ve 14. günlerde, kontrol grubuna kıyasla daha az diş hareketi tespit edilmiştir. Mezial PDL mesafesi, TZP ve TFP gruplarında 3 ve 7. günlerde kontrol grubuna kıyasla daha fazla bulunmuştur. Aktif osteoblast sayısının 14. günde TZP grubunda diğer gruplara göre daha az olduğu tespit edilirken, aktif osteoklast sayısı bakımından gruplar arası fark bulunamamıştır. Sonuçta TZP'nin ortodontik diş hareketini yavaşlattığı/engellediği ve ortodontik diş hareketini hızlandırıcı bir yöntem olarak kullanılamayacağı ortaya konmuştur. TFP'nin ise ortodontik diş hareketi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Trombositten zengin plazma; trombositten fakir plazma; ortodontik diş hareketi.

AN EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF EFFECTS OF PLATELET RICH AND PLATELET POOR PLASMA ON ORTHODONTIC TOOTH MOVEMENT

Sibel AKBULUT

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Orthodontics

PhD. Thesis, June 2015

Supervisor: Associate Professor Ahmet YAĞCI

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of growth factors that PRP and PPP contains on orthodontic tooth movement in rats. For this purpose 54 male wistar albino rats were used. 6 of them used as donors and PRP and PPP derived from this donors' whole bloods with a proper technique. Other 48 rats divided into 3 groups and were fitted with a close coil spring directing a mesial force of 50 gr on the right maxillary first molar. First group has no injection. Second group has a single dose of 0,1 ml PPP and the third group has 0,1 ml PRP injection immediately after appliance insertion. Distance between maxillary molar and incisor is measured before appliance fitted and after the rats sacrificed in all of the groups. The animals were killed at 1, 3, 7, 14 days post-appliance insertion and maxillary first molar distal root mesial and distal pdl regions examined for active osteoblast, osteoclast numbers and mesial- distal pdl distances histologically. After statistical analyses PRP group showed fewer tooth movement than control at day 3 and 14. Mesial pdl distance measurements were higher at day 3 and 7 in PPP and PRP groups than control. While active osteoblast number was fewer in PRP group at day 14, active osteoclast number showed no significant differences among the three groups. As a result it was concluded that PRP inhibits orthodontic tooth movement and it can not be used as an accelerating method for orthodontic tooth movement. Also no statistically significant effect of PPP on orthodontic tooth movement was detected in this study.

Keywords: Platelet rich plasma; platelet poor plasma; orthodontic tooth movement.

İÇİNDEKİLER

TROMBOSİTTEN ZENGİN VE FAKİR PLAZMANIN ORTODONTİK DİŞ HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR	ix
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ORTODONTİK DİŞ HAREKETİ.....	3
2.1.1. Optimum ortodontik kuvvet	4
2.1.2. İndirekt kemik rezorbsiyonu.....	4
2.1.3 Ortodontik diş hareketi fazları.....	5
2.2. DİŞ HAREKETİNDEN SORUMLU ANATOMİK YAPILAR.....	5
2.2.1. Periyodontal ligament.....	5
2.2.2. Alveoler ligament	6
2.3. DİŞ HAREKETİNDE ROL ALAN HÜCRELER	7
2.3.1. Fibroblastlar.....	7
2.3.2. Osteoblastlar	7
2.3.3. Osteoklastlar	8
2.4. ORTODONTİK MEKANİK TEORİLERİ	10

2.4.1. Piezoelektrik teori.....	10
2.4.2. Basınç gerilim teorisi.....	11
2.5. SİTOKİNLERİN DİŞ HAREKETİNDEKİ ROLÜ.....	13
2.6. TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP) VE TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMA(TFP)	14
2.6.1. Kan bileşenleri.....	14
2.6.1.1. Trombositler	15
2.6.1.2. Büyüme faktörleri.....	16
2.6.2.1.1. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	18
2.6.2.1.2. Transforme edici büyüme faktörü	18
2.6.2.1.3. Vasküler endotelial büyüme faktörü.....	19
2.6.2.1.4. İnsülin benzeri büyüme faktörü.....	19
2.6.2.1.5. Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü	20
2.6.2.1.6. Epitelial büyüme faktörü	20
2.6.2. Trombositten zengin plazma	20
2.6.3. Trombositten fakir plazma	23
2.6.4. TZP ve TFP'nın elde edilmesi.....	23
2.6.5. TZP hazırlama teknikleri.....	24
2.6.6. TZP'nın muhafaza edilmesi	27
2.6.7. TZP'nın aktivasyonu	27
2.6.8. TZP avantaj ve dezavantajları	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araştırmada kullanılan malzemeler.....	30
3.2. Araştırmada kullanılan farmakolojik ajanlar.....	31
3.3. Histolojik değerlendirmede kullanılan malzemeler.....	31
3.4. Deney hayvanlarının bakımı.....	32
3.5. Çalışma gruplarının tanımlanması.....	33
3.6. Aparenin hazırlanması ve uygulama şekli	34
3.7. TZP ve TFP elde edilmesi	35
3.8. TZP ve TFP uygulaması.....	38
3.9. Ortodontik diş hareket miktarının ölçülmesi	39
3.10. Histolojik uygulamalar	39
3.10.1. İmmünohistokimya.....	43
3.10.2. Histolojik kesitler üzerinde PDL mesafesinin ölçümü	44

3.10.3. Hücre sayımı.....	45
3.11 İstatistiksel değerlendirme.....	46
4.BULGULAR	47
4.1. Denekler ve kullanılan apareylerle ilgili gözlemsel bulgular	47
4.2. Deneklerin ağırlık değişim bulguları	47
4.3. M1-I mesafesi ölçümlerindeki güvenilirlik	48
4.4. Ortodontik diş hareketinin metrik ölçüm bulguları	49
4.5. M1'in saf mezializasyon miktarının grup içi ve gruplar arası kıyaslanması	52
4.6. Periyodontal ligament aralığı mesafesi ölçüm bulgularının grup içi ve gruplar arası kıyaslanması	54
4.7. Osteoblast sayısı bulgularının grup içi ve gruplar arası kıyaslanması.....	58
4.8. Osteoklast sayısı bulgularının grup içi ve gruplar arası kıyaslanması.....	60
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
5.1. Amaç.....	66
5.2. Deney hayvanlarının seçimi	70
5.3. Deney hayvan sayısının belirlenmesi	71
5.4. Ortodontik diş hareketi oluşturacak mekaniğin seçimi	71
5.5. Uygun kuvvet miktarının belirlenmesi	72
5.6. Deney süresinin belirlenmesi.....	72
5.7. Deney dizaynı	73
5.8. Diş hareket miktarının ölçülmesi.....	73
5.9. TZP elde etme metodunun belirlenmesi	73
5.10. Trombosit sayısı ile büyüme faktörü seviyesi arasındaki ilişki.....	74
5.11. Uygulanacak TZP konsantrasyonunun belirlenmesi	74
5.12. TZP aktivasyonu için uygun yöntemin belirlenmesi	75
5.13. TZP enjeksiyonu.....	76
5.14. PDL genişliği bulgularının yorumlanması	76
5.15. Osteoblast sayısı bulgusunun yorumlanması.....	77
5.16. Osteoklast sayısı bulgusunun yorumlanması.....	79
5.17. Diş hareketi bulgularının yorumlanması	81
5.18. Sonuçlar	83
6.KAYNAKLAR.....	84
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ACD-A	: Asit sitrat dekstroza
ADP	: Adenozin difosfat
ALP	: Alkalen fosfataz
ATP	: Adenozin trifosfat
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
BMP	: Bone morphogenetic protein / Kemik morfogenetik protein
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
COL1	: Trombojenik fibriler kollojen tip I
COL3	: Trombojenik fibriler kollojen tip III
CPD	: Sitrat fosfat dekstroza
CTGF	: Connective tissue growth factor / Bağ dokusu büyüme faktörü
EGF	: Epithelial growth factor / Epitelyal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast growth factor
IFN- α	: İnterferon- α
IGF	: Insulin-like growth factor / İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
KGF	: Keratinocyte growth factors / Keratinosit büyüme faktörleri
LDGF	: Leucocyte derived growth factor / Lökosit kaynaklı büyüme faktörü
M-CSF	: Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MMP	: Metalloproteinaz
OPG	: Osteoprotegerin
PAS	: Periyodik asit schiff
PDEGF	: Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü
PDGF	: Platelet derived growth factor / Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü

PDL	: Periyodontal ligament
PGE2	: Prostoglandin E2
PTH	: Parathormon
RANK	: Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü Ligandı
TGF- β	: Transforming growth factor- β / Transforme edici büyüme faktörü β
TFP	: Trombositten fakir plazma
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TRAP	: Tartarat rezistan asit fosfataz
TZP	: Trombositten zengin plazma
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Bir dişe uygulanan sürekli kuvvetler karşısında oluşan fizyolojik cevap.....	12
Tablo 2.2. Literatürde belirtilen farklı TZP hazırlama protokolleri.....	26
Tablo 3.1. Parafin doku takip yöntemi aşamaları.....	41
Tablo 3.2. Masson trikrom boyama yöntemi	42
Tablo 3.3. İmmunohistokimya boyama yöntemi	44
Tablo 4.1. Kontrol grubundaki deneklerin ağırlık değişim bulguları	48
Tablo 4.2. TFP grubundaki deneklerin ağırlık değişim bulguları	48
Tablo 4.3. TZP grubundaki deneklerin ağırlık değişim bulguları.....	48
Tablo 4.4. Kontrol grubu deneklerde 1, 3, 7, 14. günlerde deney (sağ), kontrol (sol) tarafalarında ölçülen diş hareket miktarları ve bu değerlerin birbirinden çıkarılması ile elde edilen M1'in saf mezializasyon miktarı	49
Tablo 4.5. TFP grubu deneklerde 1, 3, 7, 14. günlerde deney (sağ), kontrol (sol) taraflarında ölçülen diş hareket miktarları ve bu değerlerin birbirinden çıkarılması ile elde edilen M1'in saf mezializasyon miktarı	49
Tablo 4.6. TZP grubu deneklerde 1, 3, 7, 14. günlerde deney (sağ), kontrol (sol) taraflarında ölçülen diş hareket miktarları ve bu değerlerin birbirinden çıkarılması ile elde edilen M1'in saf mezializasyon miktarı	49
Tablo 4.7. Kontrol grubu saf mezializasyon miktarı değerlerinin 1-14. günler arası grup içi karşılaştırmaları	52
Tablo 4.8. TFP grubu saf mezializasyon miktarı değerlerinin 1-14. günler arası grup içi karşılaştırmaları	52
Tablo 4.9. TZP grubu saf mezializasyon miktarı değerlerinin 1-14. günler arası grup içi karşılaştırmaları	52
Tablo 4.10. M1'in saf mezializasyon miktarı değerlerinin kontrol, TZP ve TFP grupları arası karşılaştırmaları.....	53
Tablo 4.11. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş sıkışan taraf PDL genişliği değişimlerinin 1- 14. günler arası karşılaştırmaları.....	55
Tablo 4.12. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş sıkışan taraf PDL genişliği değişimlerinin kontrol, TFP ve TZP grupları arası karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.13. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL genişliği değişimlerinin 1- 14. günler arası karşılaştırmaları.....	56

Tablo 4.14. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL genişliği değişimlerinin kontrol, TFP ve TZP grupları arası karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.15. Sağ ve sol M1 distal PDL bölgelerindeki osteoblast sayılarının gruplar arası karşılaştırılması	58
Tablo 4.16. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki osteoblast sayılarının 1- 14. günler arası karşılaştırmaları.....	58
Tablo 4.17. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki osteoblast sayılarının kontrol, TZP ve TFP grupları arası karşılaştırmaları.....	59
Tablo 4.18. Sağ ve sol M1 mezial PDL bölgelerindeki osteoklast sayılarının gruplar arası karşılaştırılması	61
Tablo 4.19. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş basınç tarafı PDL bölgesindeki osteoklast sayılarının 1- 14. günler arası grup içi karşılaştırmaları ..	61
Tablo 4.20. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş basınç tarafı PDL bölgesindeki osteoklast sayılarının kontrol, TZP ve TFP grupları arası karşılaştırmaları.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kuvvet uygulandığında ve kalktığında oluşan piezoelektrik sinyal	11
Şekil 2.2. PDL'teki artan basınç karşısında kan damarlarında oluşan değişimin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.3. Trombositlerin temel yapısı ve içeriği	16
Şekil 3.1. Sıçanların barındığı polikarbonat kafesler	33
Şekil 3.2. Maksiller 1. molar - keser diş arası (M1-I) mesafenin ölçülmesi	35
Şekil 3.3. Apareyin ağızdaki şematik gösterimi.....	35
Şekil 3.4. NiTi springlerin ağız içi görünümü.....	36
Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan santrifüj cihazı.....	37
Şekil 3.6. TZP ve TFP elde etme aşamaları	38
Şekil 3.7. Bukkal mukozadan uygulanan TZP enjeksiyonu.....	39
Şekil 3.8. Histolojik kesitlerde ölçülen PDL mesafesinin gösterilmesi	40
Şekil 3.9. Distal kökte tipping hareketi ile oluşan basınç- gerilim bölgelerinin şematik gösterimi.....	45
Şekil 4.1. Kontrol grubu 1-14. günlerdeki M1 saf mezializasyon ve keser eğilme miktarlarının grafiksel gösterimi.....	50
Şekil 4.2. TFP grubu 1-14. günlerdeki M1 saf mezializasyon ve keser eğilme miktarlarının grafiksel gösterimi.....	50
Şekil 4.3. TZP grubu 1-14. günlerdeki M1 saf mezializasyon ve keser eğilme miktarlarının grafiksel gösterimi.....	51
Şekil 4.4. Kontrol, TFP ve TZP gruplarındaki saf mezializasyon miktarlarının grafiksel gösterimi.....	54
Şekil 4.5. Sıkışan taraf PDL genişliği mesafesinin günlere göre değişimi	56
Şekil 4.6. Gerilim tarafı PDL genişliği mesafesinin günlere göre değişimi	57
Şekil 4.7. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki aktif osteoblast sayısının 1-14 günler arası değişiminin grafiksel gösterimi.....	59
Şekil 4.8. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş basınç tarafı PDL bölgesindeki aktif osteoklast sayısının 1-14 günlerde gruplar arası karşılaştırılması	63

- Şekil 4.9. $\times 40$ büyütmede osteoblast hücre sayımı için alkalen fosfataz primer antikoru ile immunohistokimya metodu ile boyanmış preparatlar. ok: alveoler kemik yüzeyi boyunca dizilim gösteren osteoblast hücreleri..... 64
- Şekil 4.10. $\times 40$ büyütmede osteoklast hücre sayımı için TRAP primer antikoru ile immunohistokimya metodu ile boyanmış preparatlar. ok: alveoler kemik yüzeyi boyunca dizilim gösteren osteoklast hücreleri..... 65

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ortodonti diş-çene-yüz yapılarındaki iskeletsel, dişsel veya bu ikisinin kombinasyonu şeklinde görülen düzensizliklerin tedavisi ile uğraşır. Bununla beraber ortodontik tedaviler içinde en geniş yeri dişsel düzensizlikler ve tedavisi almaktadır. Dişsel düzensizliklerin tedavisi, uygulanan mekanik kuvvetlere karşı diş kökünü çevreleyen periyodontal ligament (PDL) ve alveoler kemikte meydana gelen bir takım biyolojik olaylar sonucu, dişlerin alveol kemiği içinde hareket ettirilmesi şeklinde gerçekteşmektedir.

Ortodontik diş hareketi ile ilgili çalışmalar ilk olarak 1900'lü yıllarda Sandstedt'in köpekler üzerinde yaptığı çalışma ile başlamıştır (1). Bu çalışmada ortodontik kuvvetlere karşı dentoalveoler yapılarda meydana gelen değişiklikler ilk kez histolojik olarak incelenmiştir.

Günümüzde de diş hareketi ile ilgili deneysel çalışmalar uzun süren ortodontik tedavi süresinin kısaltılması yönünde yoğunlaşarak devam etmektedir. Bu çalışmalar kapsamında, dişin hareketi esnasında bu kuvvete karşı dokularda oluşan direnci azaltmak ve çevresel faktörleri değiştirmek suretiyle, mekanik kuvvetleri hücresel cevaba dönüştüren fizyolojik araçlar olarak düşünölen prostaglandinler, sitokinler, nöropeptitler, lökotrienler ve nitrik oksit, relaksin gibi maddeler kullanılmıştır. Bazı deneysel çalışmalarda ise mekanik kuvvetlere elektriksel akım (piezoelektrik) (2), palslı elektromanyetik (3), lazer ve gen stimölasyonu gibi fiziksel uygulamalar eklenerek diş hareketinin önemli oranda hızlandırılabilieceği belirlenmiştir. Ayrıca paratiroid hormon (4), D vitamininin aktif şekli olan 1,25 dihidroksikolekalsiferol ve kortizon gibi sistemik faktörlerin uygulanmasının da diş hareketini hızlandırdığı bildirilmiştir. Bunun yanında kortikotomi, distraksiyon osteogenezi ve

kotizasyon gibi cerrahi yöntemler de diş hareketini hızlandırmada kullanılan yöntemler arasında gösterilmiştir.

Ancak bu yöntemlerin büyük kısmında kullanılan hem ajanların hem de aletlerin pahalı olması, bazılarının pratik olmayışı, bazılarının ise neden olduğu lokal ağrı, kök rezorbsiyonu gibi yan etkileri nedeniyle bu konudaki yeni arayışlar halen sürmektedir.

Trombositten zengin plazma (TZP) tedavisi özellikle son yıllarda giderek artan bir şekilde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış yeni bir yöntemdir. Başlangıçta daha çok kozmetik ve anti-aging amaçlı kullanılmış olsa da son dönemlerde kas iskelet sistemi, kronik ağrı tedavisi, tendon hasarları, romatizmal hastalıklar, estetik tıp, ortopedi, iyileşmeyen yara tedavisi gibi birçok alanda sıkça kullanılmaya başlanmıştır.

Diş hekimliğinde ilk olarak tanıtılması 1997 yılında Whitman ve arkadaşlarının hazırladığı “Platelet Gel: An Autologous Alternative to Fibrin Glue with Applications in Oral and Maxillofacial Surgery” başlıklı makale ile olmuştur. TZP’nin ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin tespit edilmesi öncelikle maksillofasiyal cerrahi alanında klinik kullanıma girmesine neden olmuştur.

Ortodontik diş hareketi sırasında meydana gelen hücresel etkileşimler paratiroid hormon, vitamin D, östrojen ve kalsitonin gibi sistemik faktörler ve sitokinler, büyüme faktörleri gibi lokal ajanlar tarafından düzenlenmektedir (5). Bu lokal ajanlardan büyüme faktörlerinin diş hareketi üzerinde olumlu etkileri bazı çalışmalar (6-8) tarafından belirtilse de bu konuda yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca büyüme faktörlerinin izole olarak elde edilmesindeki zorluk nedeniyle maliyetleri oldukça yüksektir. TZP ise içerisinde çok sayıda ve yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü içermekte olup, otojen olduğu için elde edilmesi oldukça kolay ve ucuzdur.

TZP üzerine yapılan çalışmalar, TZP’nin iyileşme sürecini hızladığı yönündedir. Ve bu etki yara iyileşmesi sırasında açığa çıkan büyüme faktörleri veya çeşitli sinyal moleküllerinin ilgili bölgeye uygulanmasıyla elde edilmektedir. Ortodontik diş hareketi sırasında da çeşitli büyüme faktörlerinin vücuttaki çeşitli hücreler tarafından eksprese edildiği bilinmektedir (9).

Bu çalışma ile TZP ve TFP (trombositten fakir plazma)’nın ortodontik diş hareket mekanizması üzerindeki olası etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ORTODONTİK DİŞ HAREKETİ

Ortodontik diş hareketi, uygulanan eksternal kuvvetler karşısında fizyolojik denge oluşturmak için dentofasiyal komplekste meydana gelen biyolojik cevap olarak tanımlanmaktadır (10).

Ortodontik diş hareketinde gözlenen doku reaksiyonları temel olarak fizyolojik diş hareketine benzemektedir. Ortodontik diş hareketinde dişlere çeşitli ortodontik araçlarla dışarıdan ilave kuvvet uygulanır. Fizyolojik diş hareketi yavaş bir süreçtir. Ortodontik diş hareketi ise daha hızlı olduğu için meydana gelen doku değişiklikleri fizyolojik diş hareketine göre daha belirgindir (11, 12).

Ortodontik diş hareketi alveoler kemik, periyodontal ligament ve gingiva gibi paradental dokulardaki remodeling ile karakterizedir. Dişe ortodontik bir kuvvet uygulandığında, periyodontal dokularda, ekstraselüler matriks, hücre membranı, hücre iskeleti, nükleer protein matriks ve genom olmak üzere beş mikro-çevrede makroskobik ve mikroskobik düzeyde bazı değişiklikler meydana gelir. Periyodontal ligamentin damarlanması ve kan akımındaki değişikliğin yanı sıra PDL ve alveoler kemik hücre iskeletlerinde meydana gelen mekanik değişiklik sonucu sitokinler, nörotransmitterler, büyüme faktörleri, koloni stimüle edici faktörler ve araziidonik asit metabolitleri gibi çeşitli anahtar moleküllerin sentezi ve salınımı gerçekleşir. Bu moleküllerin periyodonsiyumdaki çeşitli hücrelerde oluşturduğu hücresel cevap ile diş hareketi yönünde kemik rezorpsiyonu ve diğer tarafta kemik apozisyonu meydana gelir (9). Böylece kuvvet uygulanan diş alveoler kemik içerisinde bir yerden başka bir yere hareket ettirilmiş olunur. Dokularda meydana gelen bu değişiklikler ve dolayısıyla diş hareketi uygulanan kuvvet dinamik bir dengeye ulaşmaya kadar devam eder.

2.1.1. Optimum Ortodontik Kuvvet

Diş hareketi için gerekli optimum kuvvet, 1932 yılında Schwarz (13) tarafından, kapiller kan basıncına ($20-25 \text{ g/cm}^2$) eşdeğer büyüklükteki kuvvet olarak tanımlamıştır. Schwarz'a göre bundan hafif kuvvetler periyodontal ligamentte herhangi bir reaksiyona neden olmazken, bu değeri aşan kuvvetler nekrotik doku alanlarının oluşmasına sebep olur. Oppenheim (14), 1942 yılında Schwarz'ın tanımını modifiye ederek diş hareketi için en hafif kuvvetlerin kullanılmasını savunmuştur. Reitan (15) 1967 yılında hafif kuvvetlerde bile basınç bölgesinde hücresiz alanların oluştuğunu göstermiştir. Bunun yanında 1980 yılında Lee, kanin retraksiyonu için optimum kuvvetin 200 g/cm^2 olduğunu savunmuş, Rickkets ise 1998 yılında diş hareketi için optimum kuvvetin 100 g/cm^2 olduğunu iddia etmiştir (16).

Optimum ortodontik kuvvet için güncel konsept, maksimum diş hareketi meydana getirmesinin yanında, dişte, periyodontal ligamentte ve/veya alveoler kemikte minimal geri dönüşümsüz hasara neden olması ve maksimum hasta konforu sağlamasıdır (17). Profit'e göre optimum ortodontik kuvvet, maksimum veya maksimuma yakın diş hareketi sağlayan en hafif kuvvettir. Bundan daha büyük kuvvetler efektif diş hareketi sağlasa da travmatiktir ve ankraj kaybına neden olur (10).

Diş hareketi için gerekli optimum kuvvetin değeri ise her diş ve bireye göre farklılık gösterir. Ayrıca optimal kuvvetin büyüklüğü, gerçekleştirilen diş hareketinin tipine (tipping, bodily diş hareketi veya intrüzyon gibi) ve buna bağlı olarak kuvvetin periyodontal ligamentteki dağılımına göre de değişir. (17). Bu yüzden bu değerlerin belirlenmesinde klinik uygulamalar yol gösterici olabilir.

2.1.2. İndirekt kemik rezorbsiyonu

Dişlere ağır ortodontik kuvvetler uygulandığında ise, basınç altında sıkışan periyodonsiyumda kan akımının tamamen durması sonucu beslenemeyen doku alanları ortaya çıkar. Diş kökü ile alveol kemiği arasına sıkıştırılmış olan dokunun hücresiz camsal görünümü 'hyalinazasyon' olarak adlandırılır. Hiyalinizasyon bölgelerinde hücre sitoplazma ve nükleusu çözülürken (pyknosis), fibrillerin büyük çoğunluğunun kaldığı elektron mikroskobunda görülmüştür. Hyalinizasyon bölgelerinde hücresel faaliyet durduğundan, alveol kemiği, kemik iliği boşluklarında oluşan osteoklastlar tarafından, arkadan periodonsiyuma doğru, indirekt kemik rezorbsiyonu ile eritilir (18).

2.1.3. Ortodontik diş hareketi fazları

Ortodontik diş hareketi miktarının, zamana bağlı değişiminin 3 fazlı olduğu kabul edilmektedir (19, 20).

Initial faz

Periyodontal dokunun gerilmesi ve distorsiyonuna bağlı oluşan diş hareketidir. Bu fazda oluşan diş hareketi oldukça hızlıdır. 1-3 gün devam edebilir.

Gecikme fazı veya lag faz

Bu fazda PDL histolojik olarak incelendiğinde, hiyalinize ve devital olduğu görülür. Bu nedenle bu fazda diş hareketi ya çok az olur ya da hiç olmaz. Bu faz hiyalinize doku rezorbe olana kadar devam eder.

Hızlanma fazı veya Post-lag faz

Hiyalinize dokunun indirekt rezorbsiyon ile ortadan kaladırılmasını takiben bu fazda direkt kemik rezorbsiyonları ile hızlı bir diş hareketi gözlenir.

2.2. DİŞ HAREKETİNDEN SORUMLU ANATOMİK YAPILAR

Ortodontik diş hareketinden başlıca sorumlu yapılar dişi çevreleyen PDL ve alveoler kemiktir.

2.2.1. Periyodontal Ligament (PDL)

PDL, diş kökü ile alveol kemiği birbirine bağlayan kollojen lifler, çeşitli hücreler, doku sıvısı, damarlar, sinirler ve propriyoseptif reseptörleri barındıran fibröz bir bağ dokudur.

PDL'in ana komponenti diş kök yüzeyini örten sementten, alveoler kemik yüzeyini örten lamina dura arasında uzanan kollojen liflerdir (10). Dişler, PDL içerisindeki bu fibriller sayesinde alveol kemik içerisindeki alveoler boşluklarda asılı dururlar.

Alveol ve diş kökü arasında uzanan PDL fibrilleri, diş hareketi sırasındaki rezorbsiyon-apozisyon süreci de dâhil olmak üzere asla kesintiye uğramaz. Diş hareketi esnasında PDL'te üç ayrı bölge gözlenir. Bunlar alveol kemiğine komşu diş periyodontal bölge, semente komşu iç periyodontal bölge ve bu iki bölge arasındaki ara periyodontal bölgedir. Kemik apozisyonu olan taraftaki diş periyodontal bölge kemik dokudaki sharpey fibrillerine dönüşürken, rezorbsiyon tarafında rezorbe olan kemik dokudaki sharpey lifleri, PDL fibrilleri haline

gelmektedir. Yani kemik dokudaki sharpey lifleri ve PDL'teki kollojen lifler birbirinin devamı niteliğindedir (21).

Her ne kadar PDL'in büyük kısmı, kollojen fibriller tarafından oluşturulsa da; PDL'i oluşturan diğer iki major komponentten birincisi vasküler ve nöral yapılar boyunca uzanan değişik tipte mezenkimal hücreleri içeren hücresel elemanlardır. Periyodontal ligamentin temel hücresel elemanı, daha sonra fibroblast, osteoblastlar ve sementoblastlara farklılaşacak olacak diferansiye olmamış mezenkimal hücrelerdir (22). PDL'in remodelingi sırasında fibroblastlar yeni kollojen matriks materyal üretirken, fibroblastlar daha önce üretilen kollojeni yıkar. PDL'in ikinci büyük komponenti ise doku sıvısıdır. PDL boşluğu, vasküler sistem tarafından üretilen sıvı ile doludur ve bu pöröz duvarlara sahip sıvı dolu oda, şok absorbe edici görevi görür (10).

PDL içindeki kan damarları ise kemiğe yakın 1/3'te yerleşmiştir. Ayrıca PDL içerisinde olası ağrıyı algılayan serbest sinir uçları ile basınç ve konum algılayan kompleks propriyoseptif reseptörler bulunur (10).

2.2.2 Alveoler Kemik

Alveoler kemik embriyogenik nöral krista dokusundan köken alır ve intramembranöz olarak şekillenir. Dış yüzeyinde kortikal, iç kısımlarda ise spongiyöz yapıya sahiptir. Periosteum ile örtülüdür. Vücuttaki diğer kemikler gibi matriks, hücreler ve sudan oluşur. Matriks çeşitli organik maddeler ve mineral içerir. Kemik dokunun %35'i organik, %65'i inorganik matriksten oluşur. Organik matriksin ise %90'ı tip 1 kollojen, kalanı non-kollojen matriks proteinleridir. Kemiğin mineral yapısı, kollojen fibrilleri ile aynı doğrultuda yerleşim eğilimi gösteren, hidroksiapatit kristalleri tarafından oluşturulmuştur. Kemik doku hücreleri ise osteoblast, osteoklast ve osteosit hücreleri olmak üzere üç tiptedir.

Alveoler kemik, dişleri barındıran alveoler boşluklar ve bu boşlukların kemik duvarlarında birçok küçük kanala sahiptir. Dişe bir kuvvet uygulandığında, PDL'te açığa çıkan ekstraselüler matriks sıvısı, bu küçük kanallar vasıtasıyla kemik iliği boşluklarına doğru hareket eder. Ayrıca yine bu kanallar yardımıyla hematopoetik hücrelerin kemik iliğinden baskı alanına doğru göçü gerçekleşir.

Alveoler kemik de diğer kemikler gibi üzerine uygulanan kuvvete appozisyon-rezorbsiyon ile cevap verir. Diş hareketi de diş uygulanan kuvvetin PDL aracılığı ile alveoler kemiğe

iletilmesi ve alveol kemiğin sıkışma bölgesinde rezorpsiyonel, gerilme bölgesinde apozisyonel aktivite göstermesi ile ortaya çıkar.

2.3. DİŞ HAREKETİNDE ROL ALAN HÜCRELER

Ortodontik diş hareketi sırasında periyodonsiyumda meydana gelen yeniden şekillenmeden sorumlu başlıca hücreler periyodontal ligament ve kemik doku içerisinde bulunan fibroblastlar, osteoblastlar ve osteoklastlardır (23).

2.3.1. Fibroblastlar

Fibroblastlar, periyodontal ligamentin baskın hücreleridir. PDL'in ve komşu alveol kemiğin normal yapısının korunması, tamir edilmesi ve rejenerasyonundan sorumludurlar (24). Diş hareketi sırasında meydana gelen kollojen sentezi ve yıkımında esas rol oynayan hücrelerdir. Osteoblast veya sementoblastlara farklılaşabilirler (25).

Kollojen, elastin fibriller ve non-fibriler glikoproteinden oluşan ekstrasellüler matriks sentezlerler. Belirli gerilim kuvvetlerinin etkisiyle sentezledikleri ekstrasellüler matriks proteinlerinin miktarı değişir (24). İn vitro şartlarda mekanik uyarılara prostoglandin-E₂ (PGE₂) sentezi ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) artışı ile cevap verirler (26).

2.3.2. Osteoblastlar

Bu hücreler ayrıca osteoklastların diferansiyasyonunu ve aktivitesini kontrol ederler (27). İri tek bir çekirdeğe sahip, kübik ya da prizmatik hücrelerdir. Sitoplazmaları koyu bazofiliktir. Kuvvetli alkalin fosfat (ALP) ve PAS (periodic acid-schiff) pozitif reaksiyon verirler (28).

Osteoblastlar tarafından sentezlenen ekstrasellüler matriks çok çeşitli proteinler içermektedir. Bu ekstrasellüler matriks proteinlerden en baskın olanı tip 1 kollojen fibrillerdir. Ayrıca glikoproteinler (osteonektin, osteopontin, fibronektin, osteoklasin), proteoglikanlar (biglikan, dekorin, hyaluronan) ve bazı enzimler (alkalin fosfat, kollojenaz) yine bu matriksi oluşturan protein yapılarıdır. Bunların yanında kemik matriks aynı zamanda TGF- β (transforming growth factor- β), IGF (insulin-like growth factors), BMP (bone morphogenetic proteins), PDGF (platelet-derived growth factor), ve FGF (fibroblast growth factors) gibi bazı büyüme faktörlerini de içermektedir. Bu büyüme faktörlerinin remodeling sırasında kullanılmak üzere matriks içinde depolandığı varsayılmaktadır (27, 29).

Diş hareketi sırasında gerilme bölgesinde yer alan osteoblastlar yeni kemik oluşumundan sorumludur. Aynı zamanda sıkışma bölgesindeki rezorbe alanların yeniden şekillendirilmesi de osteoblastların görevidir (30).

Osteoblast aktivitesi endokrin, parakrin ve nöral olmak üzere üç şekilde düzenlenir: Endokrin etki; bir hücrenin salgıladığı ürünün kendisinden uzak bölgelerdeki hücrelere kan yoluyla ulaşması ve oradaki hücreleri etkilemesine denir. Parakrin etki ise hücrenin ortama salgıladığı ürün ile komşu hücreleri etkilemesidir.

Endokrin regülasyonda, parathormon (PTH) önemli role sahiptir. Osteoblastlar PTH reseptörü eksprese ederler. Osteoblast hücreleri, hiperparatiroidizmde olduğu gibi sürekli ve yüksek dozlarda PTH ile karşılaştığında, Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü Ligandı (RANKL) salınımını artırırlar. Artan RANKL, osteoklast hücrelerindeki (Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü) RANK ile birleşir. Böylece osteoklast formasyonu ve kemik yıkımı uyarılır. Ancak, yine osteoblast hücreleri, aralıklı ve düşük dozlarda PTH ile karşılaştığında, buna kendi kemik yapım aktivitelerini arttırarak cevap verirler. Osteoblast hücrelerindeki PTH reseptörünün devamlı veya aralıklı uyarılması sonucu farklı etkiler göstermesinin arkasındaki moleküler mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Vitamin D3 ise kalsiyum ile birlikte osteoporözlü hastalarda kemik yapımını arttırmak için yaygın olarak kullanılır. Ancak bu tedavinin etkinliği tartışmalıdır (27).

Parakrin regülasyonda ise BMP'ler ve TGF- β 1'i de içeren TGF- β süperfamilyasına ait birkaç üyenin osteoblast farklılaşması, proliferasyonu ve fonksiyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (27).

2.3.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar monositer-hematopoetik hücreler tarafından üretilen çok çekirdekli 20-100 μ m çapında dev hücrelerdir. 2'den 50'ye kadar değişen sayılarda nükleusları vardır. Esas özellikleri kemik matrikse yapışıp, protein ve mineral yapıları yıkan asit ve litik enzim sentezlemeleridir (31, 32). Bu lizozomal enzimler; tartarat rezistan asit fosfataz (TRAP), katepsin K ve kollojenaz (MMP-13), jelatinaz (MMP-9) gibi bazı metalloproteinazlardır. Fonksiyonlarından dolayı makrofaj türü hücre olarak da kabul edilirler. Ayrıca mononükleer fagositer sisteme dâhil hücrelerdir. Ancak aktif fagositoz yapmazlar. Kemikte Howship lakünası adı verilen boşluklarda yerleşmişlerdir. Kemiğe bitişik yüzeylerinde, hücre yüzeyinin genişletilmesinde rol oynayan fırça kenarlı hücre uzantıları gözlenir. Osteoklastlar içerdikleri

kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiği rezorbe ederler. Eritici enzimlerle eritilen kemik dokusu uzantılarla hücre içine alınır (32).

Diş hareketi sırasında aktive olan osteoklastlar, bölgedeki mevcut hücre popülasyonundan ve uzak bölgelerden kan yoluyla PDL'in sıkışma bölgesine doğru göç eden hücrelerden kaynaklanırlar. Bu bölgede ilk osteoklastların görülmesi 48 saati bulabilir. Bölgeye gelen osteoklastların PDL'in sıkışma bölgesine komşu alveoler kemik duvarında rezorbsiyon meydana getirmesiyle diş hareketi gerçekleşir (30).

Bir bireyin kemik rezorbsiyon potansiyeli ve bunun sonucu oluşan ortodontik diş hareketi, olgun osteoklast ve prekürsör hücrelerin açığa çıkmasına, osteoklast farklılaşmasına ve kemik-PDL yüzeyindeki aktif osteoklast sayısına bağlıdır (31).

Osteoklast formasyonu, osteoblastik hücreler ve T hücrelerince eksprese edilen RANKL tarafından düzenlenir. RANKL, tümör nekroz faktörü (TNF) ligand ailesinden bir proteindir ve preosteoklastların üzerindeki reseptörü, RANK ile bağlanarak, onların osteoklastlara dönüşmesini uyarır ve böylece kemik rezorpsiyonu oluşur. RANK, birçok hücrenin hücre zarında bulunan bir proteindir. Ancak preosteoklastlara RANKL'ın bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. Osteoprotegerin (OPG) ise genellikle osteoblast hücrelerinden salgılanan bir proteindir. Osteoklastlar üzerinde bulunan RANK reseptörlerine bağlanmak için RANKL ile yarışır ve RANK ile bağlandığında osteoklastogenezisi inhibe eder. RANKL/OPG oranının artması kemik metabolizmasındaki dengenin rezorbsiyon lehine bozulduğunun göstergesidir (33, 34).

RANKL aracılığı ile osteoklastogenezisi uyardığı bilinen hormonlar; PTH, 1.25(OH)₂-vitamin D₃, tiroid hormonlar, glukokortikoidler ve retinoidlerdir. Kalsitonin ve östrojen ise osteoklastogenezisi inhibe eder (21, 27).

Sitokinlerden ise interlekin 1 (IL-1), IL-6, IL-11, IL-15, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) artmış RANKL seviyesi aracılığıyla osteoklastogenezisi stimüle ederken; IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-27, interferon- α (IFN- α) ve IFN- β osteoklastogenezisi inhibe eder. Prostaglandinler (PG), özellikle PGE₂, osteoblastlar üzerindeki RANKL aracılığı ile osteoklast formasyonunu arttıran enflamatuvar mediyatörlerdir (27).

2.4. ORTODONTİK MEKANİK TEORİLERİ

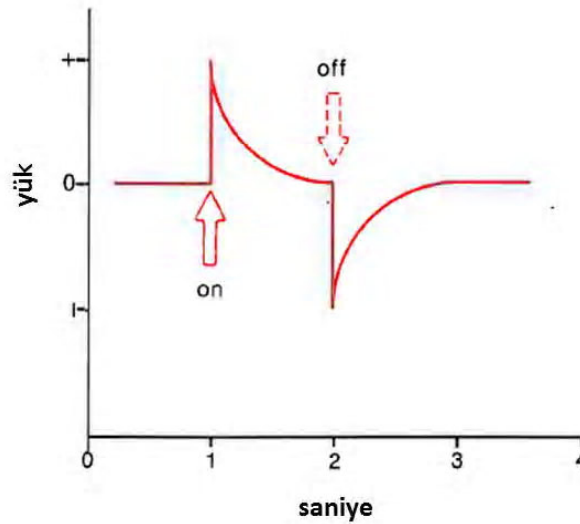
2.4.1. Piezoelektrik Teori

Biyoelektrik teori, alveoler kemik eğildiğinde oluşan elektrik sinyaller sonucu kemik metabolizmasını kontrol edildiğini ve böylece diş hareketi meydana geldiğini savunur. Diş hareketini başlatan elektrik sinyallerin başlangıçta piezoelektrik olduğu düşünülmüştür. Piezoelektrisite, kristal yapıya sahip birçok maddede gözlenebilir. Kristal yapıdaki bir bozulma sebebiyle elektronların kristal örgü içinde bir yerden başka bir yere hareket etmesi sonucu bir elektrik akımı oluşur. Piezoelektrisite, hem inorganik hem de organik yapılarda gözlenebilir. Organik yapılardan sadece kemik minerali değil, kollojenin kendisi de piezoelektrik özelliğe sahiptir (10).

Piezoelektrik sinyalin iki alışılmadık karakteri vardır. Bunlardan ilki; bir kuvvet uygulandığında oluşan piezoelektrik sinyalin, kuvvet devam etse dahi, çabucak sıfıra düşmesidir. İkincisi ise kuvvet kalktığında, ters yönde eşit büyüklükte bir sinyalin oluşmasıdır (Şekil 2.1).

Her iki karakter de elektronların, basınçla deforme olan kristal yapı ile birlikte hareket etmesi ile açıklanabilir. Kemik veya kollojen gibi bir kristal yapıya kuvvet uygulandığında, çok çabuk bir şekilde sıfıra düşen bir akım üretilir. Kuvvet kalktığında ise, zıt yönde bir akım gözlenir. Piezoelektrik etki, kristal kafes içindeki elektronların kristaller ile birlikte göçünden kaynaklanır.

Basınçla deforme olan kristal yapıda elektron göçü ve bunun sonucunda bir elektrik yükü oluşur. Kuvvet devam ettiği sürece kristal yapı stabildir ve ilave bir elektrikselsel olay gözlenmez. Piezoelektrisite hızla sıfıra düşer. Kuvvet kaldırıldığında ise kristal, orijinal şekline döner ve elektronlarda ters yönde bir akım gözlenir. Buradaki ritmik aktivite sürekli bir elektrik sinyal etkileşimi oluşturur (10).



Şekil 2.1. Kuvvet uygulandığında ve kalktığında oluşan piezoelektrik sinyal (10).

2.4.2. Basınç-Gerilim Teorisi

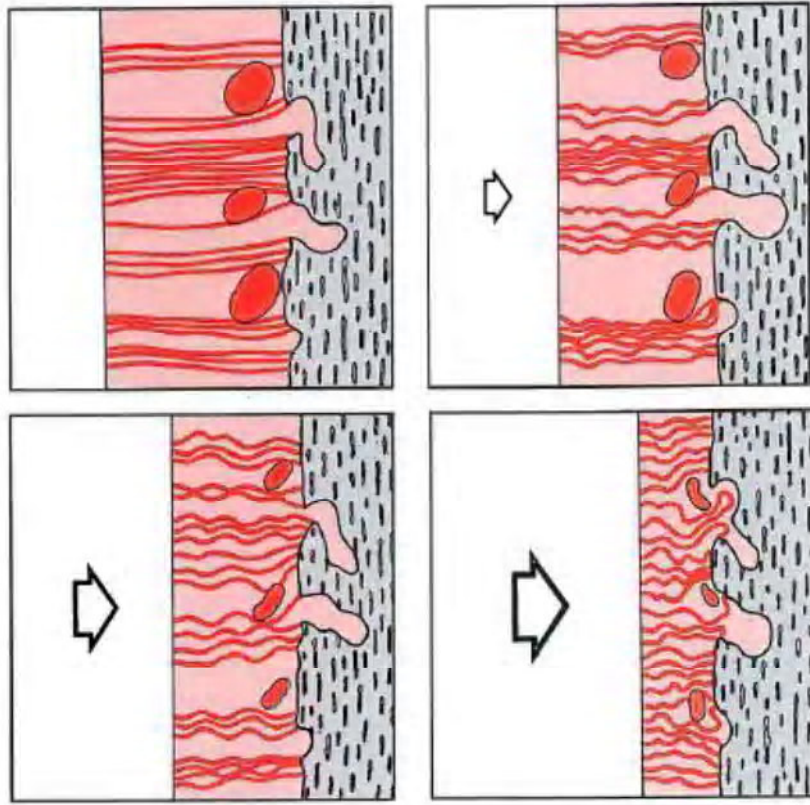
Klasik diş hareketi teorisi olan basınç-gerilim teorisine göre hücresel farklılaşma, sonuç olarak da ortodontik diş hareketi için gerekli uyarının kaynağı elektriksel değil, kimyasal sinyallerdir. Gerçekten alveoler kemik remodelingi ve diş hareketini sağlayan olaylar içinde kimyasal haberciler önemli yer tutar. Ortodontik kuvvet etkisiyle periyodontal ligament liflerinde hareket yönünde sıkışma ve aksi yönde bir gerilim meydana gelir. Oluşan bu basınç ve gerilim bölgeleri PDL'teki kan akışında bazı değişikliklere sebep olur. Basınç tarafında vasküler daralmaya bağlı olarak kan akışı azalırken, gerilim tarafında kan akışı devam eder veya artar. Çok fazla gerilen PDL bölgelerinde ise kan akışı geçici olarak azalabilir (Şekil 2.2). Kan akışındaki bu değişimler, biyokimyasal olarak bazı değişikliklere neden olur. Örneğin basınç tarafında oksijen seviyesinde ani düşüş görülürken, gerilim tarafında artabilir ve ilgili diğer metabolitlerin oranlarında dakikalar içinde değişiklik gözlenir. Bu kimyasal değişimler, direkt olarak ya da diğer aktif biyolojik ajanların salınımını uyarak hücresel farklılaşmayı ve aktiviteyi başlatır. Bu yönüyle diş hareketi 3 aşamaya ayrılabilir: 1. PDL üzerindeki basınçla alakalı olarak kan akışındaki değişiklik 2. Kimyasal habercilerin oluşması/salınımı 3. Hücrelerin aktivasyonu (10).

Profit'e göre diş hareketinin oluşmasında piezoelektrisite ve basınç gerilim kuramının her ikisi birlikte rol alır. Hafif kuvvet uygulanan dişte ilk saniyede alveoler kemik eğilir, piezoelektrik sinyal oluşur. 1-2. saniyelerde PDL sıvısı eksprese olur ve diş PDL aralığı kadar

hareket eder. 3-5 saniyelerde PDL içindeki kan damarlarından, basınç tarafındakiler sıkışırken, gerilim tarafındakiler dilate olur. PDL fibrilleri ve hücreler mekanik distorsiyona uğrar. Dakikalar içinde kan akışı değişir, oksijen basıncında değişiklik başlar, prostoglandin ve sitokinler salınır. Birkaç saat sonra metabolik değişiklikler oluşur; kimyasal mesajcılar hücrel aktiviteye etki eder, enzim seviyeleri değişir. Yaklaşık 4 saat sonra artmış cAMP seviyesi tespit edilebilir, PDL içinde hücrel diferansiyasyon başlar. İkinci gün ise osteoklast ve osteoblastların kemik soketin remodelinginde görev almasıyla diş hareketi başlar (10). (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Bir diş uygulanan sürekli kuvvetler karşısında oluşan fizyolojik cevap (10).

Zaman		Olay
Hafif kuvvet	Ağır kuvvet	
<1 sn	<1 sn	PDL sıvısı sıkıştırılmaz, alveoler kemik eğilir, piezoelektrik sinyal oluşur.
1-2 sn	1-2 sn	PDL sıvısı eksprese olur; diş, PDL aralığı kadar hareket eder.
3-5 sn		PDL içerisindeki kan damarları basınç tarafında sıkışır, gerilim tarafında dilate olur; PDL lifleri ve hücreleri mekanik distorsiyona uğrar.
Dakikalar		Kan akışı değişir, oksijen basıncı değişmeye başlar, sitokinler ve prostoglandinler salınır.
Saatler		Metabolik değişiklikler oluşur. Kimyasal mesajcılar hücrel aktiviteyi etkiler. Enzim seviyeleri değişir.
~4 saat		Artmış cAMP düzeyi saptanır, PDL’te hücrel farklılaşma başlar.
~2 gün		Osteoklast/ osteoblastlar kemik soketi remodele eder, diş hareketi başlar.
	3-5 sn	PDL’teki kan damarları basınç tarafında tıkanır.
	Dakikalar	Sıkışan PDL bölgesine gelen kan akımı kesilir.
	Saatler	Sıkışan bölgede hücre ölümü olur.
	3-5 gün	Komşu dar boşluklarda hücre farklılaşması ve indirekt kemik rezorpsiyonu başlar.
	7-14 gün	İndirekt rezorpsiyon ile sıkışan PDL bölgesine komşu lamina dura eritilir, diş hareketi oluşur.



Şekil 2.2. PDL'teki artan basınç karşısında kan damarlarında oluşan değişimin şematik gösterimi (10).

2.5. SİTOKİNLERİN DİŞ HAREKETİNDEKİ ROLÜ

Sitokinler kemik remodeling ve ortodontik diş hareketi içerisindeki inflamatuvar prosese direkt olarak dâhil olan ekstraselüler sinyal proteinleridir. Kemik ve PDL hücrelerinin farklılaşması, aktivasyonu ve apoptozisinde doğrudan veya dolaylı olarak görev alırlar.

RANKL ve M-CSF (makrofaj koloni stimüle edici faktör), osteoblast ve apoptotik osteositlerden salgılanır. Osteoklastların bir araya toplanması, farklılaşması ve aktivasyonundan sorumlu en önemli proinflamatuvar sitokinlerdir. Bu iki sitokinin bağlandığı reseptörler ise sırasıyla RANK ve c-Fms, osteoklast prekürsörlerinden ve olgun osteoklastlardan salgılanır. Ayrıca yine osteoblastlardan RANKL'ın tuzak reseptörü olan OPG salgılanır. OPG, RANKL ile birleşmek için RANK ile yarışır. RANKL osteoklast formasyon ve aktivasyonunun regülatörü iken, OPG'nin osteoklast farklılaşmasının inhibe edilmesi, osteoklastlarının aktivasyonunun baskılanması ve apoptozisin başlatılması gibi etkileri vardır (9).

Diş kompresif bir kuvvet uygulandığında PDL hücrelerinden PGE2 ve IL- 1 β salgılanır. Bunun sonucu olarak OPG salgısı azalırken, RANKL salgısı artar. Bu durum da osteoklastogenezi indükler (9).

TNF- α , ortodontik diş hareketinde tespit edilen diğer bir sitokindir. Kemik rezorbsiyonu ile akut ve kronik inflamasyonda görev alır. Osteoblastlar, epitelyal hücreler, endotelyal hücreler ile aktive olmuş monosit ve makrofajlardan sentezlenir. Osteoblastlardan RANKL, M-CSF ve diğer kemokinlerin salgılanmasını sağlayarak dolaylı olarak, osteoklastlar üzerindeki özel reseptörlere bağlanarak da direkt olarak osteoklastogenezi artırır (9).

IL-1 (alfa ve beta) ortodontik diş hareketinin erken safhalarında PDL'in sıkışan tarafında salgılanan proinflamatuvar sitokinlerden biridir. Osteoklast aktivitesini artırır ve kemik iliği hücreleri ile osteoblastların RANKL sentezini stimüle eder.

IL-6, IL-8 ve IL-11 gibi diğer sitokinler de yine ortodontik diş hareketi boyunca alveoler kemik rezorbsiyonunu stimüle eder. Bu sitokinler TNF- α ve IL-1 ile sinerjik etki gösterirler.

IL-18 ve IL-10 ise yine ortodontik diş hareketi sırasında PDL'te eksprese olan, ancak osteoklastogenezi ve kemik rezorbsiyonunu inhibe eden sitokinlerdir. Ayrıca IL-10; IL-1, IL-6 ve TNF- α sentezini de inhibe eder. Buna paralel olarak IL-10, PDL'in gerilim tarafında, basınç tarafındakinden fazla eksprese olur (9).

2.6. TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (PLATELET RICH PLASMA- PRP) VE TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMA (PLATELET POOR PLASMA- PPP)

2.6.1. KAN BİLEŞENLERİ

Kan; plazma, eritrosit, lökosit ve trombositlerden meydana gelir.

Plazma; yüksek oranda su içeren ve hücreler için taşıyıcı görevi gören kanın akıcı bileşenidir. Çeşitli iyonlar, organik, inorganik moleküllerin yanında trombositlerdekine benzer yapıda çok sayıda protein (plazma proteinleri) içerir. Plazma proteinleri bağ doku içerisindeki iyileşme mekanizmasında büyük öneme sahiptir. Başlıca plazma proteinleri; albumin, globulin ve fibrinojendir. 100 gram kanda 7- 8 gram kadardır ve bunun çoğu albumindir. Karaciğer tarafından sentezlenirler. Albumin, oluşturduğu ozmotik basınçla plazmada suyu tutar ve plazmadaki suyun damar dışına kaçmasına engel olur. Globulinler; alfa, beta ve gama globulinler (immün globulinler) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Vücudun enfeksiyonlara karşı korunmasında ve bağışıklığı sağlamada rol alırlar. Fibrinojen, kanama durumunda kanın

pıhtılaşmasında rol alır. Yara bölgesinde adeta bir ağ gibi davranarak trombositleri ve gerekli diğer hücreleri tutan bir proteindir (35, 36).

Eritrositler dokuların oksijenlenmesinden sorumlu iken, lökositler enfeksiyonla mücadele eden kan hücreleridir. Trombositler ise hemostazdan, yeni bağ doku oluşumundan ve revaskülarizasyondan sorumludur (36).

2.6.1.1. Trombositler

Trombositler kemik iliğindeki megakaryosit denilen öncü hücrelerden üretilen, ömürleri 7-10 gün olan, renksiz, 2-4 μm çapında, disk şeklindeki kan hücreleridir (Şekil 2.3). Hemostaz (koagülasyon), inflamasyon, antimikrobiyal direnç, anjiyogenez ve doku iyileşmesi gibi vücuttaki önemli fonksiyonlarda görev alır (37). Önceleri trombositlerin daha çok koagülasyondaki rolleri üzerine odaklanılmasına rağmen, son yıllarda trombositlerin büyüme faktörleri, immün sistem mesajcıları, enzimler ve diğer biyoaktif komponentleri içeren 1100 civarında proteini barındırdığının ortaya konulmasının ardından hemostatik özelliğinden başka vücutta enflamasyon, yeni bağ doku oluşumu, angiogenez (yeni damar oluşumu), antimikrobiyal direnç ve doku iyileşmesi gibi önemli fonksiyonlara sahip olduğu anlaşılmıştır (37-39).

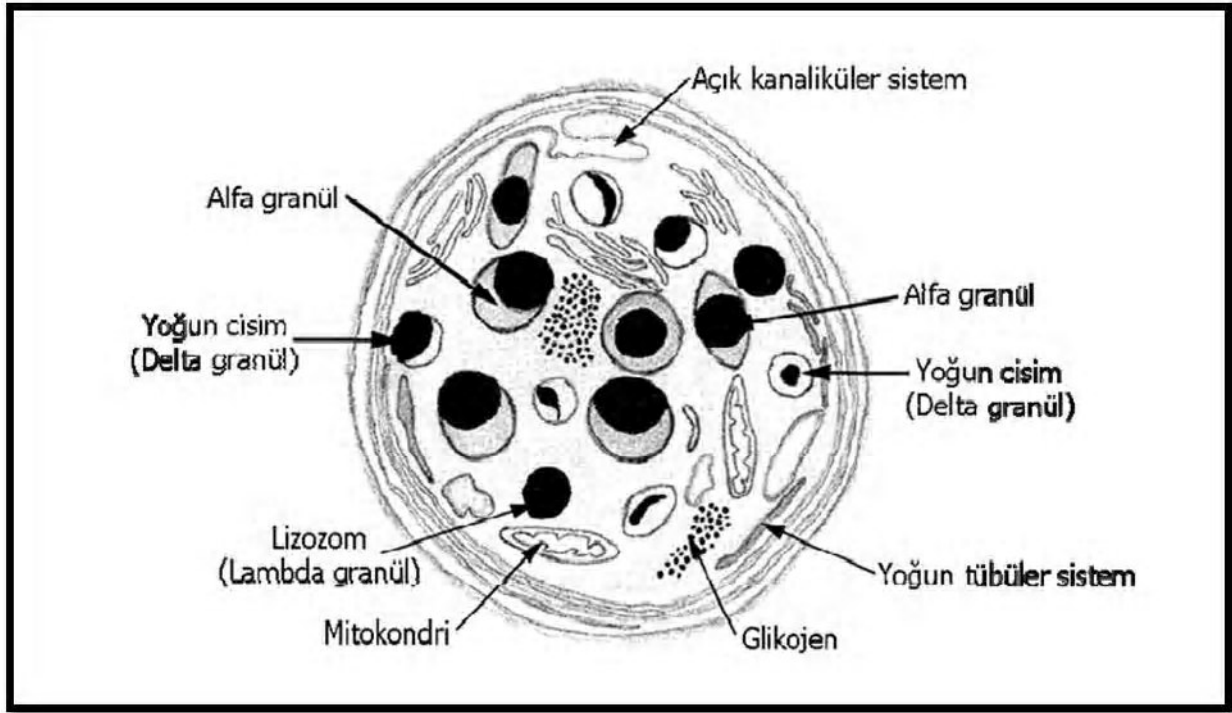
İnsanda total kan değerleri 150.000- 400.000/ μl 'dir. Kanda eritrositlerden sonra en çok bulunan hücre grubudur (38). Tıpkı eritrositler gibi çekirdekleri yoktur. Trombositler, plazma membranının sitoplazma içerisine parmak şeklinde uzantılarından oluşan ve “açık kanaliküler sistem” adı verilen bir kanal sistemine sahiptirler. Bu sistem sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmasını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Hücre membranı üzerinde birçok girinti, çıkıntı ve iç vezikül barındırır. Bu yüzden morfolojisi deniz süngerine benzer. Veziküller, alfa, delta ve lambda (lizozomal) olmak üzere üç tip granülden oluşur. Değişik boyut ve içeriklere sahip olan bu granüllerin işlevleri de farklıdır (39).

Alfa granüller 300-500 nm çapındadırlar ve diğerlerine oranla çok daha heterojen bir içeriğe sahiptirler. Boyut ve sayıları nedeniyle trombositlerin majör granülleri olarak kabul edilirler. Pıhtılaşma, inflamasyon ve doku iyileşmesine katkı sağlayan 30'a yakın protein ve büyüme faktörü ihtiva ederler.

250-300 nm çapa sahip olan delta granüller, elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle dens görünmektedirler. Bu nedenle delta granüller “yoğun

cisimler” olarak da adlandırılırlar. Diğer trombositleri aktive eden adenosin-difosfat (ADP) ve adenosin trifosfat (ATP) gibi molekülleri içerip, serotonin deposu olarak görev yaparlar.

Lambda granüller (lizozomlar) ise çapları 175-250 nm civarında olup, içinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimleri olan granüllerdir. Ayrıca bakterisidal etkisi olan glikozidaz ve proteaz gibi proteinleri de içerirler (40).



Şekil 2.3. Trombositlerin temel yapısı ve içeriği (41).

2.6.1.2. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri ağırlıkları 4000-60000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen proteinlerdir. Proliferasyon, diferansiyasyon, kemotaksis, doku ve organların morfogenezini gibi hücrel olayları düzenlerler (42, 43). Hematopoez, enflamasyon, anjiyogenez ve doku iyileşmesinin yanında kemik remodelinginde rol alırlar (9).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre proliferasyonu, migrasyonu ve diferansiyasyonunu gibi bir hücrel cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur (43).

Büyüme faktörleri trombositlerin alfa granülleri içerisinde inaktif formda depolamış olarak bulunmaktadır. Bu granüller içerisindeki başlıca büyüme faktörleri;

PDGF (platelet derived growth factor - trombosit kaynaklı büyüme faktörü),

TGF- β (transforming growth factor β - transforme edici büyüme faktörü β),

VEGF (vascular endothelial growth factor - vasküler endotelial büyüme faktörü),

IGF (insulin like growth factor - insülin benzeri büyüme faktörü),

PDEGF (platelet derived epidermal growth factor- trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü) ve

EGF (epithelial growth factor- epitelyal büyüme faktörü)'dür.

Bunlar dışında literatürde; lökosit kaynaklı büyüme faktörü (Leucocyte derived growth factor, LDGF), bağ dokusu büyüme faktörü (Connective tissue growth factor, CTGF), fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast growth factors, FGF), keratinosit büyüme faktörleri (Keratinocyte growth factors, KGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF veya FGF-II) gibi çok sayıda büyüme faktöründen de bahsedilmektedir (43, 44).

TZP içerisindeki büyüme faktörleri, normal gen regülasyonu ve normal feed-back kontrol mekanizması ile işlev gören doğal proteinlerdir. Bu yüzden büyüme faktörlerinin ekzojen uygulanması yüksek konsantrasyonlarda olsa bile hiperplazi, bening veya malign tümör gibi herhangi bir over-reaksiyona neden olmaz (45).

Büyüme faktörleri, hücre fonksiyonları endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin mekanizmalarla sağlar.

- Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan yoluyla gider ve uzaktaki hücreleri de etkiler.
- Parakrin yolla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede lokal olarak etkilidirler.
- Otokrin faktörler, tarafından salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarını etkiler.
- İntrakrin etki; hücrenin sentezlediği ürünün, hücre dış ortamına salınmadan, tekrar kendi fonksiyonlarını etkilemesidir. İntrakrin etkide büyüme faktör/ reseptör kompleksi hücre içine alınır (43).

2.6.1.2.1. PDGF (Platelet Derived Growth Factor- Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)

32000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan PDGF, iki disülfid bağıyla bağlanmış bölümden oluşur. A ve B adını alan bu üniteler %56 oranında benzerlik gösterirler. AA, AB ve BB şekillerinde ifade edilen faktörün her üç formunun biyolojik aktiviteleri temelde benzer olup B ünitesi mitogenezi biraz daha güçlü uyartabilir. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme faktörleri salgırlar (36).

PDGF yara yerinde ilk görülen büyüme faktörüdür ve revaskularizasyon, kollajen sentezi, kemik rejenerasyonu gibi olaylara liderlik eder (46). Hasar görmüş dokudaki mitogenezi ve anjiogenezi stimüle etmesinin yanında diğer büyüme faktörlerinin etkisini de hızlandırır (47).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, kendisine özel membran reseptörüne sahip hücrelerdeki mitogenezi uyarır. Mezenkimal kök hücrelerdeki mitozu stimüle eder. Bu sayede bölgedeki kemik doku, bağ doku ve kapiller doku hücrelerinin sayısında bir artış olur. Makrofajların aktivasyonu da yararın debridmanı sağlanır (45, 47).

Osteoblastlardaki hücre mitozunu ve osteoid üretimini indükler. Kemik dokudaki osteoblastik aktiviteyi stimüle etmesinin yanında rezorbsiyon sürecini de başlattığı bilinmektedir (45, 46).

Endotelyal hücrelerdeki mitozu ve yeni kan damarları için bazal lamina sekresyonunu stimüle eder (45).

Fibroblastlardaki mitozu ve kollojen üretimini indükler. (45)

2.6.1.2.2. TGF- β (Transforming Growth Factor β - Transforme Edici Büyüme Faktörü β)

TGF- β , birbirine disülfid bağlarıyla bağlı iki zincirli bir polipeptit olup molekül ağırlığı yaklaşık 25000 daltondur. TGF- β ailesinde bilinen en az 47 büyüme faktörü bulunmaktadır. TGF- β 1 ve TGF- β 2, TGF- β ailesinin iki üyesidir. Kemik morfogenetik protein (Bone morphogeneic protein- BMP) de bunlardan biridir (45, 47).

TGF- β hücre mitozunu stimüle eder, aynı zamanda matriks üretimi ve dokuların kartilaj veya kemiğe farklılaşmasına rehberlik eder. Bu yüzden morfojen özellik taşır yani hücrelerin özelleşmeye başlamasına yol açan sinyal moleküllerinden biridir (45).

Hemen hemen tüm hücrelerin TGF- β için reseptörü vardır ve en azından teorik olarak TGF- β ile uyarılabilirler (43) . Daha çok fibroblastlar, kemik iliği hücreleri ve preosteoblastlara etki

ederler. TGF- β 'nın en önemli görevlerinden biri osteoblast öncü hücrelerinin kemotaksisi ve mitogenezisini sağlamasıdır (47). Ayrıca en fazla TGF- β reseptörü bulunduran hücreler osteoblastlardır (48).

TGF- β , makrofajlar için kemotaktiktir; fibroblast kemotaksisi ve proliferasyonunu uyarır. TGF- β , kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinir. Ayrıca kollajenazı aktive eden diğer faktörlerin uyarıcı etkisini azaltır. TGF- β fibroblastlarca fibronektin ve proteoglikan sentezini; keratinositlerce de fibronektin sentezini uyarır. Yara kontraksiyonunda rol oynar. Matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile remodeling olayında görev yapar (43).

2.6.1.2.3. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor- Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

İlk olarak 1983 yılında tanımlanan ve tümör hücreleri tarafından salındığı tespit edilen VEGF'in, vasküler endotelyal hücrelerin geçirgenliğini artırdığı, bu nedenle hücreler arası mesafede ve vücut boşluklarında sıvı birikimine neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ilk olarak 'vasküler permeabilite faktörü' olarak adlandırılmıştır (49).

Vasküler endotelyal büyüme faktörünün bilinen farklı büyüklüklerde beş adet izoformu mevcuttur. Benzer biyolojik etkilere sahip 121, 145, 165, 189 ve 206 formlarından baskın olarak bulunanları VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ formlarıdır (49).

VEGF, bazal lamina sentezi ve anjiyogenezi stimüle eder (45). Vasküler permeabiliteyi artırır (9). Vazodilatasyon, endotelyal hücre proliferasyonu ve monosit migrasyonu, VEGF varlığında hızlanan diğer biyolojik süreçlerdir (49).

2.6.1.2.4. IGF (Insulin like Growth Factor- İnsülin benzeri büyüme faktörü)

IGF-I ve IGF-II olmak üzere 2 formu vardır. İnsülin ile aynı reseptöre bağlanır. Aminoasit dizilimi insan proinsülinine benzediğinden bu adı almıştır. IGF ailesinin diğer üyesi olan IGF-II ile %50 homolog dizilime sahiptir. Dişler de dâhil olmak üzere birçok dokunun gelişiminde rol oynar (42, 50).

IGF'ün her iki formu da kemik dokuda bulunur. Ancak kemik matrikste baskın olan form IGF-II'dir. (42).

IGF-I sekresyon sonrasında dokularda lokal olarak etki gösterebildiği gibi, sistemik dolaşıma katılarak uzak organlarda endokrin etkiler de gösterebilmektedir. Dolaşımda bulunan IGF-I'in kaynağı büyük ölçüde karaciğer dokusudur. Buna karşın dokularda lokal olarak etki

gösteren IGF-I, keratinosit, osteoblast ve fibroblast gibi değişik hücreler tarafından üretilir. Hücre kültürleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar IGF-I'in fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, çizgili kas hücreleri, epitelyal hücreler, tiroid hücreleri ve nöronlar gibi birçok hücre üzerinde mitojenik olduğunu göstermektedir. Osteoblastlar tarafından sentezlenen IGF-I kemik yapımını stimüle eder. IGF-I periyodontal ligament hücreleri için kemotaktiktir. Periyodontal ligament fibroblastları ve protein sentezi üzerinde güçlü etkiye sahiptir. (42, 50).

2.6.1.2.5. PDEGF (Platelet Derived Epidermal Growth Factor- Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü)

PDEGF, daha çok mezodermal olmak üzere, hem mezodermal hem ektodermal birçok hücre için mitojeniktir. Yara iyileşmesindeki fibroblast oluşumu, granülasyon dokunun oluşumu, epitelizasyon ve anjiogenezi stimüle eder (51).

2.6.1.2.6. EGF (Epithelial Growth Factor- Epitelyal Büyüme Faktörü)

Deri ve mukoz membrandaki bazal hücrelerin mitozunu stimüle eder (45).

2.6.2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) – Platelet Rich Plasma (PRP)

Trombositten zengin plazma, sınırlı bir kan hacmi içerisindeki, kanın hücresel elemanlarına ayrılması ile hazırlanan, büyüme faktörlerinden zengin, otojen trombosit konsantrasyonudur. Bir kan plazmasının TZP olarak kabul edilebileceği minimum trombosit konsantrasyonu tartışmalıdır. Periferik kandaki trombosit sayısı $200 \times 10^3/\text{mm}^3$ tür. Genel görüş TZP'nın tam kandaki trombosit sayısının en az 4 katı veya mm^3 'te 1 milyon trombosit içermesi gerektiği yönündedir. Yapılan çalışmalarda normal kandaki trombosit konsantrasyonunun 4-7 katı trombosit içeren plazmanın klinik yarar sağladığı gösterilmiştir (45).

Normal kanda %93 eritrosit, %6 trombosit ve %1 lökosit bulunurken, TZP'da %5 eritrosit, %1 lökosit ve %94 trombosit olmak üzere eritrosit ve trombosit oranları tersine döner (45).

TZP jel veya trombosit jel ise otojen TZP'nın kalsiyum klorid solüsyonunda çözündürülmüş sıgır trombini ile karıştırılması sonucu elde edilir. Yoğun fibrin ağı içerir (52) .

TZP içerisinde yüksek trombosit konsantrasyonu ve dolayısıyla büyüme faktörlerinin yanında, beyaz kan hücreleri, fagositik hücreler, çeşitli vazoaktif ve kemotaktik ajanlar ile doğal fibrinojen bulunmaktadır (53).

TZP ilk defa 1987 yılında kardiyovasküler cerrahide, açık kalp ameliyatı sonrasında, homolog kan ürünlerinin aşırı transfüzyonunu önlemek için kullanılmıştır (54). Diş hekimliğinde ilk olarak tanıtılması ise 1997 yılında Whitman ve arkadaşlarının hazırladığı “Platelet Gel: An Autologous Alternative to Fibrin Glue with Applications in Oral and Maxillofacial Surgery” başlıklı makale ile olmuştur (55). Daha sonra Marx ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada, mandibular defekt rekonstrüksiyonu için kullandıkları kansellöz kemik greftleri üzerine TZP uygulamışlar ve TZP’nin kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir (47). O yıllardan günümüze dek TZP diş hekimliğinde ve genel tıp alanlarında güvenle kullanılmaktadır.

TZP’nin diş hekimliğindeki kullanım alanları (45)

A. Kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı uygulamalar

Sinüs lift greft operasyonları (56)

Periyodontal defekt tedavisi

Alveoler kemik agumentasyonları (57)

Alveoler yarı damak tamiri

Oral/nazal fistül tamiri

Majör tümör veya travma ilişkili defektlerin rekonstrüksiyonu

Dental implant cerrahisinde kemik greftleme operasyonlarında (58)

B. Yumuşak doku rejenerasyonunu içeren uygulamalar

Serbest gingival greftleme

Bağ doku greftleri

İmplant cerrahisi sırasındaki yumuşak doku flepleri

Koronale pozisyone flepler

TZP’nin genel tıp alanındaki uygulamaları

- TME hastalıklarında TZP'nın eklem içi enjeksiyonu (59) (Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi)
- Saç dökülmesinin önlenmesi (Dermatoloji) (60)
- Yüz gençleştirmek amacıyla (Dermatoloji) (61)
- Omuz eklemi Rotator cuff yaralanmaları (Ortopedi ve Travmatoloji) (62)
- Tenisçi dirseği (dış bağ zorlanması/lateral epikondilit) (Ortopedi ve Travmatoloji) (63)
- Golfçu dirseği (iç bağ zorlanması/medial epikondilit) (Ortopedi ve Travmatoloji) (64)
- Uyluk arka kas (Hamstring) yaralanması
- Diz bağ zorlanmaları (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Dejeneratif diz hastalıkları (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Patella tendiniti (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Ayak bileği burkulmaları (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Achilles tendon yaralanmaları (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Plantar fasciitis (topuk diken) (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Menisküs yırtıkları (Ortopedi ve Travmatoloji)
- Dejeneratif disk hernisi (bel fıtığı) (Ortopedi ve Travmatoloji) (65)
- Myofasial ağrılar
- Kronik bel ağrıları
- Hasara uğramış sinirlerin rejenerasyonu (Plastik ve Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi) (66)
- Kronik ülser ve iyileşmeyen yaraların tedavisi (67)
- Oftalmoloji (68)
- Üroloji (69)

- Kardiyovasküler cerrahi (70)
- KBB

2.6.3. Trombositten Fakir Plazma (TFP) – Platelet Poor Plasma (PPP)

TFP, TZP ile kıyaslandığında çok daha küçük miktarlarda büyüme faktörü içerir (71).

Trombositten fakir plazma, endüstriyel olarak üretilen fibrin yapıştırıcılarla benzer özelliklere sahiptir. Adeziv ve hemostatik özelliğinden dolayı ‘otolog fibrin yapıştırıcı’ olarak da adlandırılır. Ancak bu yapıştırıcılara kıyasla daha az oranda fibrinojen içerir. Bununla birlikte otolog olduğu için viral kontaminasyon ve alerjik reaksiyon riski taşımaz. Ayrıca hematoma önlemesi, operasyon süresini kısaltması ve iyileşmeyi hızlandırması gibi özellikleri bulunmaktadır (72).

2.6.4.

TZP’nın elde edilmesindeki temel prensip kanın, sıvı ve katı komponentlerinin plazmaferez adı verilen teknik ile selektif ayrılmasıdır. Stroke kanununa göre; bir sıvı içerisindeki partiküllerin çökme hızı, yerçekimi kuvvetine bağlı olarak partiküllerin çapları ile doğru orantılıdır. Bu fizik prensibine göre çapları 2 µm olan trombositlerin çökme hızı, çapları 6-8 µm olan eritrositler veya çapları 7-15 µm olan lökositlerden daha yavaştır. Bu nedenle çekim kuvvetine maruz kalan tam kan içerisindeki trombositler, kanın sıvı komponenti olan plazma içerisinde asılı kalır. Eritrosit ve lökositler ise çapları ile orantılı olarak çöker. Böylece trombositler ayrıştırılmış olunur.

TZP elde edilmesinde kullanılacak olan tam kan antikoagülan madde içeren tüplere veya enjektörlere alınır. Birçok antikoagülan mevcut olmasına karşın bunlardan sadece iki tanesinin trombositlerin metabolik ihtiyaçlarını karşıladığı ve trombositlerin zarar görmeden ayrışmalarını sağladığı bulunmuştur. Bu iki antikoagülan asit-sitrat-dekstroza-A (ACD-A) ve sitrat-fosfat-dekstroza (CPD)’dur (73).

Sonraki aşamada elde edilen tam kan arzu edilen sonuç ürüne göre 1 veya 2 basamaklı santrifüj işlemine tabi tutulur. Düşük devirde gerçekleştirilen ilk santrifüj işlemi (soft spin/seperation spin) sonrası eritrositlerin büyük kısmı dibe çöker. Trombosit ve plazmayı içeren üstte kalan kısım, bir kısım lökosit içerebilir. Trombositlerin içerisinde süspanse halde bulunduğu plazma bu haliyle kullanılabilir. Ancak tek santrifüj basamaklı TZP elde etme yöntemi ile trombosit konsantrasyonu terapötik seviyeye ulaşamayabilir. Çünkü bu santrifüj

protokolü ile trombositlerin bir kısmı, konveks-konkav şekilli eritrositler ile birlikte çökebilir. Bu yüzden genellikle iki santrifüj basamağı içeren protokoller tercih edilir (35, 45). İkinci santrifüj işlemi (hard spin/ concentration spin) sonrası ise en altta ‘buffy coat’ olarak adlandırılan ince beyaz bir çizgi ile çevrelenmiş küçük eritrosit tabakası ve bu tabakanın üzerinde açık sarı renkli hücresiz plazma gözlenir. Buffy coat içerisinde az sayıda rezidüel eritrosit hücreleri ile trombosit ve lökosit hücrelerinin neredeyse tamamı bulunur. Bu aşamada üstte kalan açık sarı renkli, hücresiz plazma Trombositten Fakir Plazma (TFP)’dır. TFP bir enjektör yardımıyla alındıktan sonra kalan kısım, trombositlerin yoğun halde bulunduğu TZP’dır. Ancak konsantre trombositlerin resüspanse edilmesi için bu kalan kısma istenilen trombosit konsantrasyonuna göre az miktarda TFP ilave edilir. Bazı yazarlar resüspansiyon işlemi elde edilen TZP’nın enjektöre çekilip, tekrar tüpün duvarına enjektör ucunu yaslayarak boşaltılması şeklinde (3 kez) tarif ederken (45), bazı yazarlar bu işlem için vorteks cihazı kullanmışlar, bazıları ise TZP’yi 30 saniye çalkalayarak trombositleri resüspanse ettiklerini belirtmişlerdir (36).

2.6.5. TZP Hazırlama Teknikleri

1990’ların başında TZP sadece hücre ayrıştırıcı veya plazmaferez cihazları ile elde edilebiliyordu. Otolog kanı; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri, trombosit tabakası (buffy coat) ve plazmaya ayırmada oldukça efektif olan bu cihazlar, oldukça pahalı ve büyük cihazlardı. Ayrıca bu cihazlarla TZP elde edilmesi için en az 450 ml (1 ünite) kan gerekiyordu. TZP’ya artan ilgi TZP elde edilmesinde daha az kan gerektiren, daha küçük cihazların geliştirilmesine sebep olmuştur (45). Bu yeni geliştirilen cihazlar büyük kabul görmüş ve hatta hücre ayrıştırıcı büyük cihazların yerini almıştır. Günümüzde FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış çok sayıda TZP cihazı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır:

1. Smart PReP Platelet Concentrate System; Harvest Technologies
2. Platelet Concentrate Collection System (PCCS); 3i/Implant Innovations Incorporated
3. GPS Platelet Separation Kit; Biomet
4. Magellan Autologous Platelet Separator; Medtronic
5. Secquire Cell Separator; Perfusion Partners
6. AutoloGel Process Centrifuge; Cytomedix

7. CATS Continuous Autotransfusion System; Fresenius HemoCare

Bu cihazların yanında TZP'nın manuel olarak uygun bir santrifüj cihazı ile elde edilebilmesi de mümkündür. Bu yolla TZP elde edilmesinde, kullanılan antikoagülan tipine ve santrifüj devir ve dakikasına göre değişen, çeşitli yazarlar tarafından tanımlanmış çok sayıda protokol bulunmaktadır (Tablo 2.2). Çok çeşitli yöntem ve cihaz bulunması nedeni ile literatürde TZP ile ilgili standart bir yöntem bulunmamakta ve dolayısıyla çok farklı sonuçlar elde edilmektedir.

TZP'nın ilk kullanılmaya başlandığı yıllarda santrifüj cihazı devir sayısı ve süresi arttırılarak TZP içerisindeki trombosit sayısının yoğunlaştırılabileceği ve dolayısı ile içerisindeki büyüme faktörü miktarının da arttırılabileceği düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalar, yüksek santrifüj değerleri ile oluşan yüksek yer çekimi kuvvetinin, trombositlerin hücre membran bütünlüğünün bozularak parçalanmasına veya erken aktivasyon oluşturarak granüller içerisindeki büyüme faktörlerinin istenilenden daha erken plazma içerisine salınımına neden olabildiğini göstermiştir. Trombosit hücre membranlarının zarar gördüğü kuvvet değeri ise 30.000g dk olarak bilinmektedir (45).

TZP hazırlama tekniklerinin klinik geçerliliği, bu tekniklerin hazırlanma süresi ve verimliliğine göre farklılık gösterir. Trombosit konsantrasyonunun doğru olarak tespit edilmesi, TZP etkinliğinin tespit edilmesi için önemlidir.

Trombosit konsantrelerindeki büyüme faktörlerinin konsantrasyonu, milimetre başına düşen trombositlerin sayısı, kullanılan santrifüjün hızı ve uygulanan işlemin tipine göre değişiklik gösterebilir (74).

Tablo 2.2. Literatürde belirtilen farklı TZP hazırlama protokolleri.

Yöntem	1. Santrifüj	2. Santrifüj
Curasan PRP sistem	2400 rpm- 10 dk	3600 rpm- 15 dk
PCCS PRP sistem	3000 rpm- 3.45 dk	3000 rpm- 13 dk
GPS sistem	1720g/ 12 dk	---
Friadent- Schütze sistem	2400 rpm/ 10 dk	3600 rpm/ 15 dk
Butterfield et al. (2005)	150 g/ 20 dk	400g/ 10dk
Anitua et al. (1999)	1500 rpm/ 6 dk	---
Marx et al. (2005)	1000g/ 4 dk	800g/ 8-9 dk
Dugrillon et al. (2002)	205 g/ 20 dk	805g/ 15 dk
Everts et al. (2006)	1720g/ 12 dk	---
Everts et al. (2006)	1660g/ 15 dk	305g/ 3 dk
Annunziata et al. (2005)	300g/ 10 dk	---
Shen et al. (2005)	1000 rpm/ 10 dk	3000 rpm/ 15 dk
Lucarelli et al. (2003)	1000 g/ 15 dk	3000 g/ 10 dk
Landesberg et al. (2000)	200g/ 10 dk	---

2.6.6. TZIP'nın Muhafaza Edilmesi

Literatürde TZIP'nın nasıl muhafaza edilmesi gerektiği ile alakalı değişik bilgiler mevcuttur. Oda sıcaklığında muhafaza edilmesi ile ilgili fikir birliği varken, trombositlerin bu sıcaklıkta kaç saat canlılıklarını koruyabildiği hakkında kesin bir bilgi yoktur.

Marx et al. (45) antikoagüle halde bulunan TZIP içerisindeki trombositlerin oda sıcaklığında muhafaza edildiğinde 8 saat boyunca canlılıklarını koruduğunu ve biyoaktif olduklarını bildirmiştir. 2009 yılında yapılan bir in vitro çalışmada ise trombositlerin oda sıcaklığında 5 gün boyunca stabil kaldığı gösterilmiştir (75). TZIP'nın daha uzun süreler muhafaza edilmesi istendiğinde, 6%'lık dimetil sülfoksit (Me_2SO) solüsyonu içerisinde dondurulması ve -80°C 'de saklanması önerilmiştir (76).

2.6.7. TZIP'nın Aktivasyonu

TZIP içerisindeki trombositlerin aktive olup, degranülasyon sonucu sitokin ve büyüme faktörlerin salınımı için birden fazla yöntem vardır. Bu yöntemler; kalsiyum klorid- trombin ilavesi, donma- çözülme döngüsü ve in vivo kollojen aktivasyonudur.

Kalsiyum klorid ve trombin aktivasyonu

Kalsiyum klorid ilaveli veya kalsiyum klorid olmadan, otolog veya sığır kaynaklı trombin ilavesi, trombositlerin aktive edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan trombin, trombositlerin aktive edilip, alfa granüllerinden sitokin ve büyüme faktörlerinin salınmasını sağlar. Ayrıca fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalize eder. Böylece sıvı haldeki TZIP solüsyonu jel hale geçer. Jel haline gelen TZIP kullanımı ile tam olarak etkisi istenen bölgeye TZIP jel yerleştirilebilir ve böylece TZIP jelin çevre dokulara kaçıışı önlenmiş olunur. Trombositlerin trombin ile aktivasyonu sık kullanılan bir prosedürdür. Ancak sığır trombinini ile ilgili hemoraji, trombozis ve immün reaksiyon gibi bazı yan etkiler bildirilmektedir. Ayrıca fibrinojenin fibrine dönüşümünü hızlandıran trombinin yüksek konsantrasyonları, fizyolojik yolla oluşan fibrin matriksten çok daha rijit fibrin ağı oluşumuna neden olur. Rijit fibrin ağı ise hücre migrasyonunu ve sitokin tutulumunu zorlaştırır (35).

Trombin ile alakalı immün reaksiyon riskini azaltmak için bazı yazarlar, aktivatör olarak sadece kalsiyum klorid kullanmışlardır (77).

Donma- Çözülme Döngüsü

Donma- çözülme döngüsü, Johnson ve arkadaşlarının (76) tarif ettiği özel bir prosedür izlenerek TZP'nın -80 °C'de dondurulup, 37°C'de tekrar çözündürülmesi esasına dayanır. Amaç degranülasyon için trombositlerde fiziksel hasar oluşturmaktır. Ancak tam bir degranülasyon için bu döngünün kaç kez tekrarlanacağı konusunda fikir birliği yoktur. Protokollerin çoğu in vitro çalışmalar için 4 donma- çözülme döngüsünü önerir (78).

Bu metot in vitro laboratuvar çalışmaları için yararlıdır. Çünkü bu yöntemle trombositler kimyasal değil, fiziksel yolla aktive olur. Ancak uzun zaman alan bu metot, klinik uygulamalar için pratik değildir (78).

İn vivo kollojen aktivasyonu

Doku içerisine enjekte edilen TZP, burada kollojen ile temas sonrası aktive olur. Kollojen, trombosit adezyon ve agregasyonunun en kuvvetli aktivatörlerinden birisidir. Özellikle trombojenik fibriller kollojen tip I ve III (COL1 ve COL3), trombositler ve kollojen arasındaki etkileşimde aracılık eden von Willebrand faktör içermesi nedeniyle kuvvetli trombosit aktivatörüdür (78).

2.6.8. TZP Avantaj Ve Dezavantajları

Avantajları

1. Hastanın kendisinden otojen olarak elde edildiği için çapraz kontaminasyon riski taşımamaktadır. Bu yüzden uygulanması güvenlidir.
2. Kısa zamanda ve kolayca elde edilir.
3. Labaratuvar şartları gerektirmez. Muayenehane ortamında bile rahatlıkla uygulanabilir.
4. Maliyeti düşüktür.
5. Uygulandığı bölgede büyüme faktörlerinin salınımı ile sert ve yumuşak dokulardaki yara iyileşmesi ve rejenerasyonu hızlandırır (45). Endotelial, epitelyal ve epidermal rejenerasyonu hızlandırır (79).
6. İyileşmekte olan dokunun vaskülarizasyonunu hızlandırır.

7. Kalsiyum klorid solüsyonunda çözündürülmüş sığır trombini ile karıştırılması sonucu jel kıvamında kullanılabilir.
8. Jel olarak kullanıldığında osteokondüksiyonu arttırmakta bu sayede greftin kemikle olan birleşmesini kolaylaştırmaktadır (79).
9. TZP'nın hemostatik etkisi bulunmaktadır. Böylece intraoperatif ve postoperatif kanama riskini azaltır.
10. Yüksek oranda lökosit konsantrasyonu TZP'ya antimikrobiyal özellik katmaktadır (80).

Dezavantajları

1. Trombositlerin aktiviteleri dış ortamda azalacağı için hazırlanan TZP'nın hemen kullanılması gerekmektedir. Trombositler 3-5 günde degranüle olurlar ve başlangıçta salgıladıkları büyüme faktörünün etkisi birkaç gün sonra sona erer (81).

Kontrendikasyonları (53)

1. Trombosit disfonksiyon sendromu
2. Ciddi trombositopeni
3. Hemodinamik olarak stabil olmayan hastalar
4. Hamilelik

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu komisyonu tarafından onaylanmıştır (Ek 1). Deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (EÜ-DEKAM) sağlanan, 6-8 haftalık, ortalama 181 gram ağırlığında 54 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan üzerinde yapılmıştır. Çalışmanın bütün deneysel safhaları EÜ-DEKAM'da yürütülmüştür. Histolojik tetkikler ise Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmamız bulgularının istatistiksel değerlendirmesi ise EÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır. Araştırmamız Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (EÜ-BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TDK-2014-4760).

3.1. Araştırmada Kullanılan Malzemeler

- Ultimate Nikel-titanyum (NiTi) close-coil spring (The International Orthodontics, Houston, TX, 77056, USA) (0,010 inç tel kalınlığı ve 0,030 inç sarmal çapı)
- 0.010 inç paslanmaz çelik ligatür teli
- Portegü (Dentaurum; 000-030-00, Germany)
- Kesici pens (Dentaurum; 016-153-00, Germany)
- Alev uçlu ince elmas frez
- Asma Motor (Universal) ve piyasemen
- Asit
- Bond

- Akıcı kompozit (Transbond™ XT adeziv, 3M Unitek, Monrovia, CA 91016, USA)
- Işık cihazı
- Ağız spatülü
- 0.01 mm hassasiyetinde dijital kumpas
- İnsülin enjektörü (30 G),
- 10 ml'lik vakumlu boş tüp.
- Dijital tartı

3.2. Araştırmada Kullanılan Farmakolojik Ajanlar

- Ketamin hydrochloride (Alfamine®-im)
- Xylazine (Rompun®-im)
- CPD (sitrata-fosfat-dekstroz) solüsyonu (Baxter Healthcare Corp, USA)

3.3. Histolojik Değerlendirmede Kullanılan Malzemeler

- ImmunoCruz™ rabbit ABC Staining System (Santa Cruz sc-2018)
- DAB Plus Substrate Staining System (Labvision TA-125-HDX)
- EDTA buffer, pH 8; 125mL (Labvision TA-125-PM2X)
- Citrate buffer, pH 6; 125mL (Labvision TA-125-PM1X)
- Polizimli lam 72 Ad/Kt
- Lamel 24x50 mm 100 Ad/Kt
- Phosphate buffer saline (PBS) 100 Tablet (Sigma P4417)
- Parafin Boncuk 10 Kg (Thermo Shandon 8330)
- Fluoromount-G 25 ml (Southernbiotech 0100-01)
- Clearmount Mounting Solution 100 ml (Invitrogen 00-8110)
- İmmunohistokimya işaretleme kalemi

- Manyetik balık 30x10 mm
- Phosphomolybdic acid hydrate 100 g (Fluka 79560-100G)
- Schiff's Reagent for microscopy and electrophoresis 500 ml (Merck 109033)
- Periodic Acid GR 100 g (Merck 100524)
- Formaldehyde solution min. 37% 2,5 Lt (Merck 104002)
- Nitric Acid 65% GR ISO 2,5 Lt (Merck 100456)
- Mikrotom Bıçağı 50'lik
- Albumin from bovine serum 50 g (Sigma A7906)
- Nem Chamber Siyah
- Rabbit Anti-TRAP/Tartrate Resistant Acid Phosphatase Polyclonal Antibody 100 µl (Bioss bs-6434R)
- UltraVision Large Vol. Detec. System anti-Polyvalent, HRP (Labvision TP-125-HL)
- Anti-Alkaline Phosphatase antibody 100 µl (Abcam ab95462)

3.4. Deney Hayvanlarının Bakımı

Çalışmada kullanılan toplam 54 adet erkek sıçan (Wistar Albino), 18-20 derece sıcaklıkta, 12 saat ışık 12 saat ise karanlık ortamda, her kafeste 4 denek olacak şekilde polikarbonat kafeslerde barındırılmıştır (Şekil 3.1). Sıçanlar, musluk suyu ve standart sıçan pelet yem ile beslenerek, DEKAM'daki veteriner hekimler kontrolünde muhafaza edilmiştir. Besin sınırlaması yapılmamıştır.



Şekil 3.1. Sıçanların barındığı polikarbonat kafesler

3.5. Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Split-mouth bir çalışma dizayn edilerek, sıçanların sağ tarafı deney, sol tarafı kontrol olacak şekilde, tüm gruplarda springler sadece sağ taraf 1. molar dişlerin mezializasyonu için kullanılmıştır. Sol tarafa aparey tatbiki yapılmamıştır.

Grup 1 (Kontrol grubu)

16 adet sıçandan oluşmaktadır. Sıçanların sağ taraf 1. molar dişlerine ortodontik kuvvet uygulanmış, sol tarafa uygulanmamıştır. Her iki tarafa da herhangi bir enjeksiyon yapılmamıştır.

Grup 2 (TFP grubu)

16 adet sıçandan oluşmaktadır. Sıçanların sağ taraf 1. molar dişlerine ortodontik kuvvet uygulanmış, sol tarafa uygulanmamıştır. Her iki tarafa da 1. molar diş bukkalinden submukozal olarak 0,1 ml TFP enjeksiyonu yapılmıştır.

Grup 3 (TZP grubu)

16 adet sıçandan oluşmaktadır. Sıçanların sağ taraf 1. Molar dişlerine ortodontik kuvvet uygulanmış, sol tarafa uygulanmamıştır. Her iki tarafa da 1. molar diş bukkalinden submukozal olarak 0,1 ml TZP enjeksiyonu yapılmıştır.

Her grup 4 alt gruba ayrılmış ve 1. alt grup ortodontik kuvvet uygulandıktan 1 gün sonra, 2. alt grup 3, 3. alt grup 7 ve 4. alt grup 14 gün sonra yüksek dozda anestezi madde uygulanarak kurban edilmiştir (82).

Her sıçanın kuyruğu yukarıda belirtilen temel grup ve alt gruplarına uygun olarak farklı renklerde boyanmıştır.

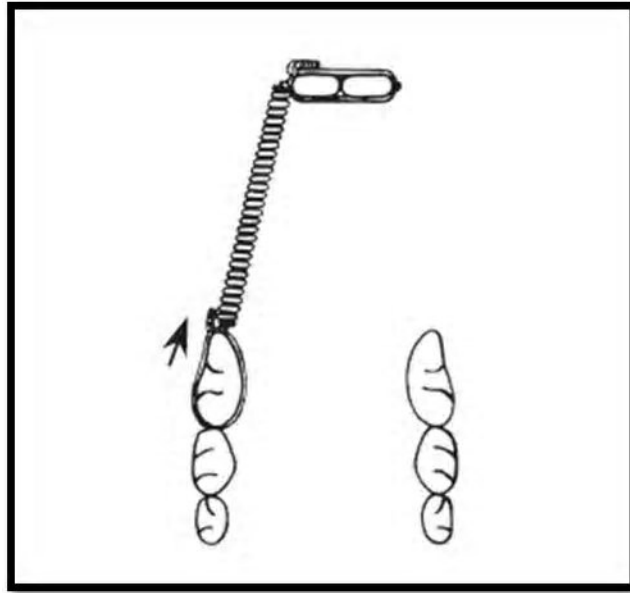
3.6. Aparenin Hazırlanması Ve Uygulama Şekli

Sıçanlarda deneysel diş hareketi oluşturmak için Brudvik ve Rygh'ın (83) kullandığı metotla 1. molar dişlere mezial yönde ortodontik kuvvet uygulanmasına karar verilmiştir. Bunun için kullanılacak aparen, kesici dişler ile maksiller 1. molar dişler arasında 50 gr kuvvet uygulayacak şekilde Nikel-titanyum close-coil springlerden üretilmiştir.

Spring uygulanacak sıçanlarda öncelikle dijital tartı ile ağırlık ölçümü yapılmıştır. Sonrasında ağırlıklarına göre uygun dozda genel anestezi (Alfamine®-im, 90 mg/kg ve Rompun®-im 3 mg/kg) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Anestezi sağlandıktan sonra keser diş (lingual taraf, gingival seviye) ve 1. molar diş mezial (en konveks nokta) arasındaki mesafe (M1-I) hem sağ hem sol tarafta dijital bir kumpas yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.2). Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve ölçülen bu 3 değerın ortalaması alınmıştır. Springler, ölçülen mesafede 50 gr kuvvet uygulayacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra springler, önce 1. molar diş etrafından geçirilen ligatür teli ile bu dişe, daha sonra aynı şekilde keser dişlere yine ligatür teli vasıtasıyla bağlanarak tutturulmuştur (Şekil 3.3). Keser dişlere uygulanan ligatürün hayvanlar tarafından çıkarılmaması için bu dişlerin distal yüzeyi alev uçlu elmas frez yardımıyla pürüzlendirildikten sonra asit, bond ve akıcı kompozit uygulanarak ligatür teli her 2 keser dişe kompozit ile sabitlenmiştir (Şekil 3.4). Springler çalışma süresince tekrar aktive edilmemiştir.



Şekil 3.2. Maksiller 1. molar - keser diş arası (M1-I) mesafenin ölçülmesi.



Şekil 3.3. Apareyin ağızdaki şematik gösterimi.



Şekil 3.4. NiTi springlerin ağız içi görüntüsü.

3.7. TZP ve TFP Elde Edilmesi

Trombositten zengin plazma (TZP) ve trombositlen fakir plazma (TFP)'nın hazırlanmasında gerekli olan kanın elde edilmesi için, donör olarak seçilen ve sonrasında herhangi bir işlem uygulanmayacak olan 6 adet sıçan kullanıldı. Kan alma işleminde kullanılacak 10 cc'lik enjektörlere antikoagülan olarak (5:1 oranında) 2'şer cc CPD (sitrata-fosfat-dekstroza) solüsyonu çekildi. Bu aşamada kullanılan CPD solüsyonu, kan merkezlerinde rutin olarak kullanılan üçlü kan torbaları (Baxter Healthcare Corp, USA) içerisinde elde edildi. Kullanılan CPD solüsyonu 26 mg/ml sodyum sitrat dihidrat, 25 mg/ml dekstroza monohidrat, 2,9 mg/ml sitrik asit ve 2,2 mg/ml monobazik sodyum fosfat monohidrat içermekte idi.

Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile sağlanan anestezi altında, intrakardiyak yoldan bu hayvanların tüm vücut kanları önceden hazırlanmış antikoagülan solüsyon içeren enjektörlere alındı ve sonrasında dekapitasyon ile ötenazi işlemi uygulandı. Sonrasında elde edilen tüm kan CPD solüsyonu ile birlikte santrifüj işlemi için uygun olan boş bir plastik tüp içerisinde toplandı.

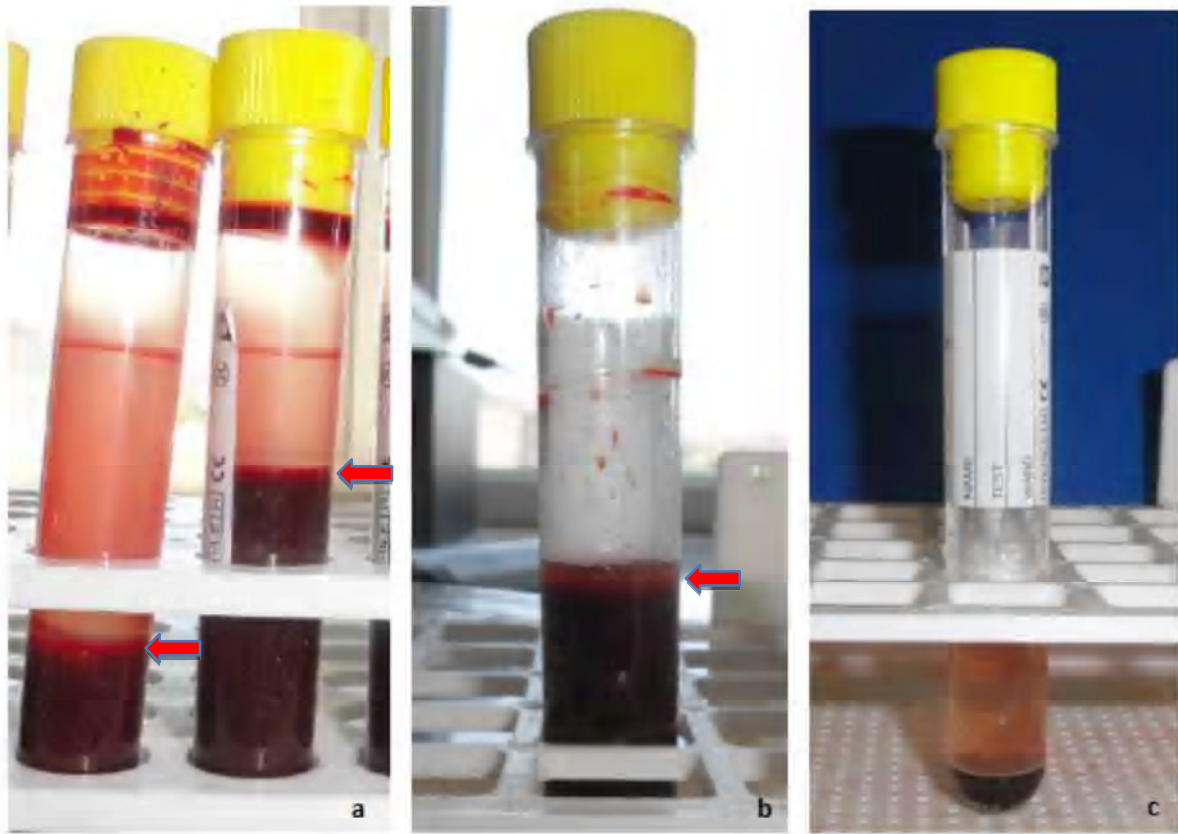
Toplanan kan uygun bir santrifüj cihazında (Nüve NF 800R, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic. A.Ş, Türkiye), 22 °C derece sıcaklıkta ve 220 g devirde 20 dakika boyunca santrifüj

işlemine tabi tutuldu (Şekil 3.5). Bu ilk santrifüj işlemi ile eritrositlerin tüpün en alt kısmında toplanması ve üstte kalan plazma, trombosit ve lökositlerin, eritrositlerden ayrışması sağlandı. İlk santrifüj işlemi sonrasında üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile en altta biriken eritrositlerin arasında, trombositlerin ve beyaz kürelerin oluşturduğu ince bir ara tabaka (“buffy coat”) izlendi (Şekil 3.6.a ve 3.6.b’de kırmızı ok ile işaretli bölgeler). Üstte biriken plazma ayrı bir tüp içerisine alındı ve trombositleri içeren ara tabaka da bu plazma üzerine eklendi. Bu ayrıştırma işlemi sırasında bir miktar eritrositin de ara tabakaya karışmasına izin verildi. Plazma ile trombositleri içeren bu tüp, ikinci kez 480 g devirde 20 dakika boyunca santrifüj edildi. İkinci santrifüj işlemi ilk ayrıştırma sırasında arta kalan eritrositlerin dibe çökmesini, trombositlerin bu eritrositler üzerinde yeniden ince bir tabaka oluşturmasını ve açık sarı renkli trombositten fakir plazmanın en üstte toplanmasını sağladı (Şekil 3.6.c). İkinci santrifüj sonrasında oluşan trombosit konsantresi ve TFP ayrıştırılarak farklı tüpler içerisinde toplandı. Daha sonra mevcut trombosit konsantresi bir miktar TFP ile seyreltilerek TZP elde edildi.

TZP elde edilmesinde kullanılan tam kandaki trombosit konsantrasyonu $793 \times 10^3/\mu\text{L}$ iken, TZP’deki trombosit konsantrasyonu $3617 \times 10^3/\mu\text{L}$, TFP ise $23 \times 10^3/\mu\text{L}$ idi. TZP, başlangıç tam kan değerinden 4,5 kat fazla trombosit içermektedir. ($1\text{mm}^3 = 1\mu\text{L}$)



Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan santrifüj cihazı.



Şekil 3.6.a.b.c. TZP ve TFP elde etme aşamaları **a.** İlk santrifüj işlemi sonrası oluşan üç tabakanın görünümü **b.** Üstteki plazmanın başka tüpe alınmasından sonraki görünüm **c.** İkinci santrifüj sonrası trombositlerin, arta kalan eritrositler üzerinde yeniden ince, beyaz bir tabaka oluşturması.

3.8. TZP ve TFP Uygulaması

Springlerin uygulandığı gün 2. grup sıçanların sağ ve sol maksiller 1. molar dişlerinin bukkalinden submukozal olarak 0,1 ml TFP enjekte edilirken, 3. grup sıçanlara 0,1 ml TZP enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar, 30 Gauge iğne çapına sahip insülin enjektörleri ile üst 1. molar diş distalinden 0,05 ml, mezialinden 0,05 ml olacak şekilde, sadece ortodontik kuvvet uygulandığı gün yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Bukkal mukozadan uygulanan TZP enjeksiyonu.

3.9. Ortodontik Diş Hareket Miktarının Ölçülmesi

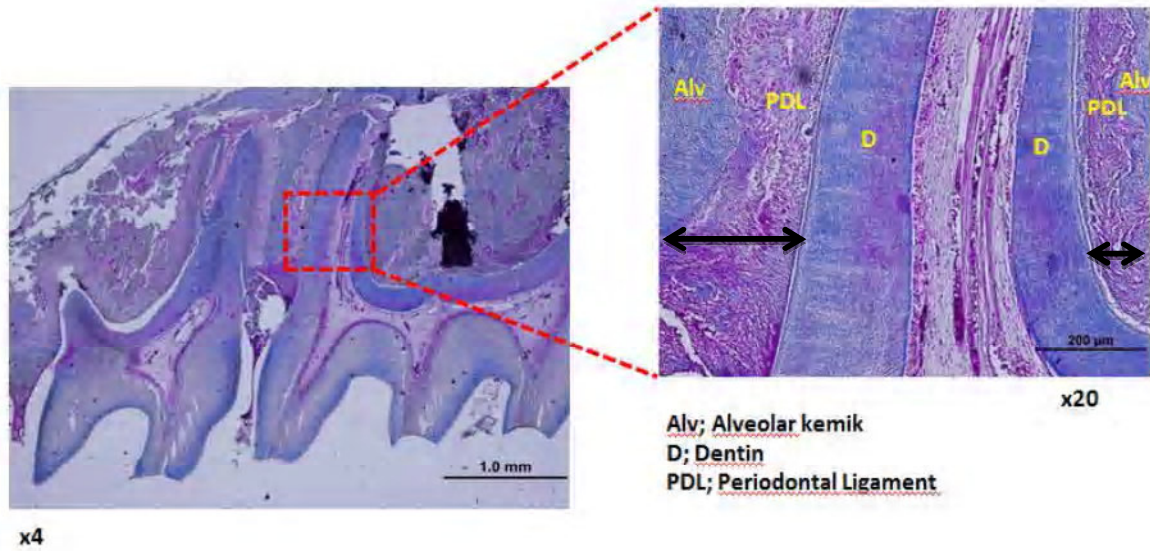
Springler uygulanmadan önce yapılan ölçümler ortodontik diş hareketi sonrası tekrarlanmıştır: Gruplarına uygun günlerde (1, 3, 7, 14) sakrifiye edilen sıçanların, keser diş (lingual taraf, gingival seviye) ve 1. Molar diş meziali (en konveks nokta) arasındaki mesafeleri, hem sağ hem sol tarafta dijital bir kumpas yardımıyla ölçülmüştür (84) (Resim 3). Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve ölçülen bu 3 değerın ortalaması alınmıştır.

Sağ taraf başlangıç uzunluk ($T0_{sağ}$) ile yine aynı taraf ortodontik uygulama sonrası uzunluk ($T1_{sağ}$) farkı kaydedilmiştir. Aynı işlem sol taraf için de tekrarlanmıştır. Saf diş hareket miktarının belirlenebilmesi için spring uygulanan sağ taraftaki uzunluk farkından, sol taraf uzunluk farkı çıkarılmıştır (84).

3.10. Histolojik Uygulamalar

Alt gruplarına uygun günlerde sakrifiye edilen hayvanların maksillaları histolojik değerlendirme için diseke edildi. %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra akan musluk suyunda 1 gün boyunca yıkandı. Dokular dekalsifikasyon aşaması için %5'lik Nitrik asitte kontrol edilerek yaklaşık 2 hafta kadar bekletildi. Dekalsifikasyon

işleminin ardından dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflandırma aşaması gerçekleştirildi. Rutin histolojik takip aşamalarının (Tablo 3.1) ardından dokular uygun pozisyonda parafin bloklar içine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler polilizinli lamlara alındı ve histomorfometrik değerlendirme için Masson's trikrom ile boyandı (Tablo 3.2). Deney gruplarına ait masson trikrom ile boyanan preparatların histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Işık mikroskobu altında preparatlardan x200 büyütmede fotoğraflar çekildi. Elde edilen görüntülerde, Image J yazılım programı kullanılarak maksiller 1. molar dişe ait distal kökün, mezial ve distal PDL genişliği (kök yüzeyi ile komşu alveoler kemiğin en koronal noktası arası mesafe) ölçüldü (82) (Şekil 3.8). Standardizasyon için ölçümler her grupta aynı bölgeden olacak şekilde yapıldı. Elde edilen ölçümler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.



Şekil 3.8. Histolojik kesitlerde ölçülen PDL mesafesinin gösterilmesi (siyah oklar).

Tablo 3.1. Parafin doku takip yöntemi aşamaları.

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%10'luk formalin	Bir gece
2	Akarsu	Bir saat
3	% 50'lik etil alkol	Bir saat
4	% 70'lik etil alkol	Bir saat
5	% 90'lık etil alkol	Bir saat
6	% 96'lık etil alkol-I	Bir saat
7	% 96'lık etil alkol-II	Bir saat
8	Absolu alkol-I	Bir saat
9	Absolu alkol-II	Bir saat
10	Ksilen	Bir saat
11	57 °C'de etüvde eriyik parafın	Bir gece
12	Gömme	

Tablo 3.2. Masson trikrom boyama yöntemi.

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Ksilen-I	15 dak
2	Ksilen-II	15 dak
3	Absolu alkol-I	10 dak
4	Absolu alkol-II	10 dak
5	% 96 Alkol	10 dak
6	% 80 Alkol	10 dak
7	%70 Alkol	10 dak
8	% 50 Alkol	10 dak
9	Akarsu	5 dak
10	Hematoksilen	7-8 dak
11	Akansu	5 dak
12	Asit fuksin	5 dak
13	Distile su	5 dak
14	Fosfomolibdik asit	5 dak
15	Preparatlar kurutulur	10-15 dak
16	Anilin blue	2-5 dak
17	Distile su	5 dak
18	%1'lik asetik asit	2 dak
19	% 50 Alkol	10 dak
20	%70 Alkol	10 dak
21	% 80 Alkol	10 dak
22	% 96 Alkol	10 dak
23	Absolu alkol-I	10 dak
24	Absolu alkol-II	10 dak
25	Ksilen-I	15 dak
26	Ksilen-II	15 dak
27	Kapatma	

3.10.1. İmmunohistokimya

Mevcut çalışmada maksiler 1. molar diş bölgesindeki Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP), ve Alkalen Fosfataz (ALP) immunoreaktivitelerini belirlemek için deney gruplarına ait preparatlara avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya boyama metodu uygulandı.

Kesitler bir gece 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra, önce ksilen daha sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Fosfat buffer saline (PBS) ile 5'er dakika olacak şekilde 3 defa yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için %10'lık EDTA buffer ile mikrodalga fırında 600W'de 3×5dk kaynatılan kesitler 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. Antijen retrieval işleminin ardından PBS ile tekrar yıkama işleminden sonraki boyama basamakları Ultra Vision Detection System (Thermo Scientific) kitine ait prosedüre göre gerçekleştirildi. Buna göre, kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika Blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler rat dokularına özgünlük gösteren primer antikor TRAP (Bioss bs-6434R, 1:500) ve Alkalen fosfataz (abcam ab95462, 1:750) primer antikoru ile 1 gece +4°C'de bekledikten sonra 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine dokulara PBS damlatıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler biotin-sekonder antikoru ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra HRP-Streptavidin enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktivite alanlarını görünür hale getirmek için 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Thermo Scientific) substrat ile 1-10 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyoinze H₂O ile yıkandı. Gill hematoksilen ile zıt boyanan kesitler birkaç kez deiyoinze H₂O ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler (Entellan®, Merck) ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. Boyama metodu Tablo 3.3'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.3. İmmunohistokimya boyama yöntemi.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat	18	PBS	3x5 dk
2	Ksilen I	5 dk	19	HRP-Streptavidin	10 dk
3	Ksilen II	5 dakika	20	PBS	3x5 dk
4	Ksilen III	5 dakika	21	DAB kromojen	3-5 dk
5	Absolü Alkol	10 dk	22	Distile su	Yıka
6	%96 Alkol	10 dk	23	Hematoksilen	3-4 dk
7	%80 Alkol	10 dk	24	Musluk suyu	5 dk
8	%70 Alkol	10 dk	25	Distile su	Yıka
9	Distile Su	3 kez yıka	26	%70 Alkol	5 dk
10	%10 EDTA	10-20 dk	27	%80 Alkol	5 dk
11	PBS	2x5 dk	28	%96 Alkol	5 dk
12	Peroxidase Block	5 dk	29	Absolü Alkol	5 dk
13	PBS	3x5 dk	30	Ksilen I	5 dk
14	Normal Serum	20 dk	31	Ksilen II	5 dk
15	Primer Antikor	Bir gece +4° C	32	Ksilen III	5 dk
16	PBS	3x5 dk	33	Kapatma	
17	Sekonder Antikor	30 dk			

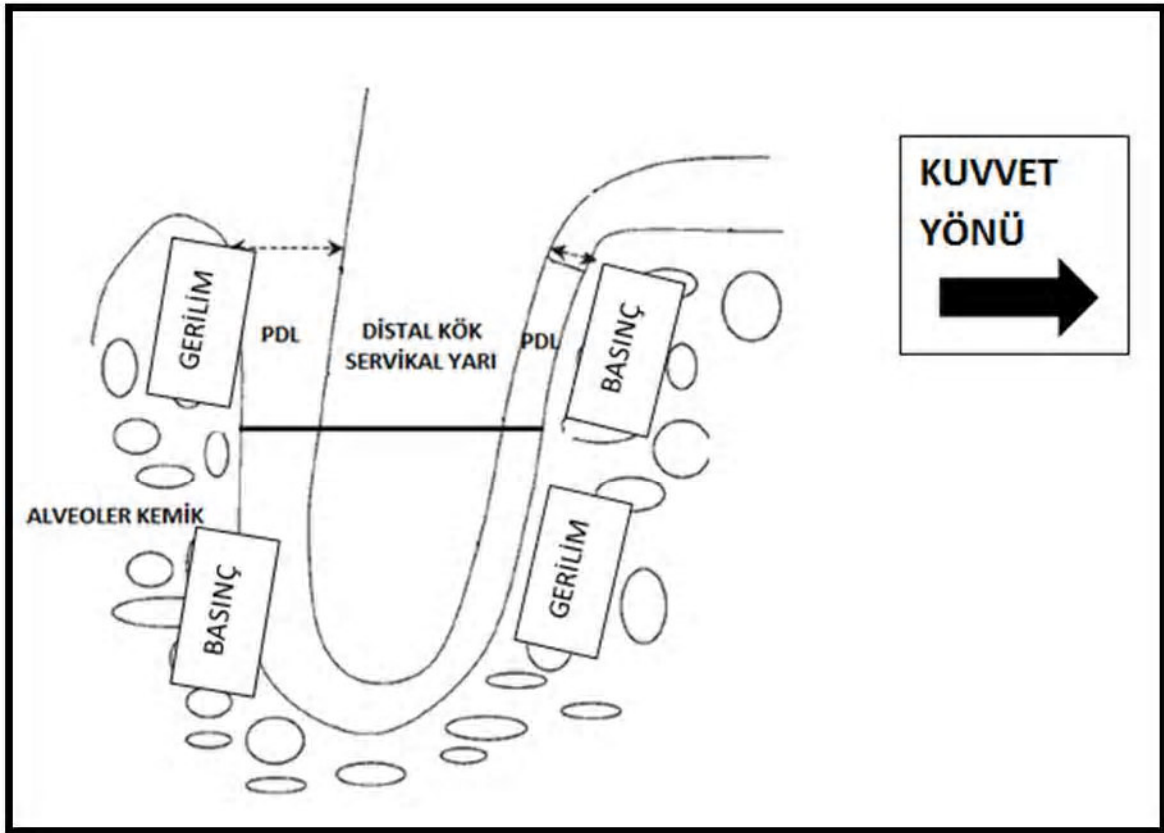
3.10.2. Histolojik kesitler üzerinde PDL mesafesinin ölçülmesi

Doku morfolojisi ve histolojik ölçümler için Masson's trikrom ile boyanmış preparatlar kullanıldı. Standardizasyon için, ölçümler sadece distal kök ile sınırlandırıldı. Bütün ölçümler x200 büyütmede, iki kez olacak şekilde yapıldı ve ortalamaları alındı.

3.10.3. Hücre Sayımı

Osteoblast ve osteoklast hücre sayımı için alkalen fosfataz ve TRAP primer antikorları ile immunohistokimya metodu ile boyanmış preparatlar kullanıldı. Hücre sayımı için x400 büyütmede çekilen fotoğraflar kullanıldı ve Image J yazılım programı kullanılarak 1. molar dişin distal kökünün servikal yarısındaki, sıkışma tarafındaki PDL boşluğundaki osteoklast ve gerilim tarafındaki PDL boşluğundaki osteoblast hücre sayımı yapıldı. Positif ekspresyon gösteren hücreler alveoler kemik ve distal kök uzunluğu boyunca yerleşim göstermekteydi. Her kesit için hücre sayımı iki kez olacak şekilde yapıldı ve ortalama değer alındı.

Kökün servikal yarısında inceleme yapılmasının nedeni; uygulanan kuvvet nedeniyle, dişte tipping meydana gelmesi, dolayısıyla mezial servikal yarıda sıkışma meydana gelirken, aynı taraf apikal yarıda gerilim oluşmasıdır. Bu çalışmada distal kök mezialindeki servikal yarı basınç bölgesi, distal kök distalindeki servikal yarı ise gerilim bölgesi olarak kullanılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Distal kökte tipping hareketi ile oluşan basınç- gerilim bölgelerinin şematik gösterimi.

3.11. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA) istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılımı Shapiro Wilk normallik testi ve Q-Q grafikleri ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler birim sayısı (n), *ortalama±standart sapma* ($\bar{x} \pm ss$), *medyan*(25.-75. Persentil) değerleri olarak verildi. Ölçüm güvenirliğinin değerlendirilmesinde sınıf içi güvenirlik katsayısı (intra-class correlation coefficient) kullanıldı. Normal dağılan değişkenlerde grupların homojenliği Levene testi ile değerlendirilerek gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırma testi olarak Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. Normal dağılmayan grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Denekler ve Kullanılan Apareyle İlgili Gözlemsel Bulgular

Çalışmada kullanılan apareyin tutuculuğunun deney süresince istenen düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Uygulama sonrası günlerde bukkal mukoza kaynaklı hafif kanama olduğu gözlemlenmiştir.

Sakrifiye edilen hayvanların bazılarında ortodontik kuvvet uygulanan tarafta 1. molar diş ile 2. molar diş arası aralanma belirgin şekilde gözlenmiştir.

4.2. Deneklerin Ağırlık Değişim Bulguları

Deneklerin başlangıç vücut ağırlıkları kıyaslandığında 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p < 0,05$)

Kontrol grubunda 1. gün sakrifiye edilen deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı azalma gözlenirken, diğer günler istatistiksel olarak anlamsız hafif artışlar gözlenmiştir. (Tablo 4.1)

TFP grubunda 1. gün sonunda deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı azalma gözlenirken, 3. gün istatistiksel olarak anlamsız hafif artış, 7. ve 14. günlerde ise istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. (Tablo 4.2)

TZP grubunda 1. gün sonunda deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı azalma gözlenirken, 3. gün istatistiksel olarak anlamsız hafif azalma, 7 gün anlamsız artış, 14. gün sonunda anlamlı artış gözlenmiştir. (Tablo 4.3)

Tablo 4.1. Kontrol grubundaki deneklerin ağırlık değişim bulguları.

	T0		T1		
Kontrol Grubu	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
1. gün	4	188,25±12,36	4	184,50±13,02	0,004*
3. gün	4	179,25±14,17	4	181,75±17,74	0,269
7. gün	4	172,00±10,45	4	180,50±20,22	0,187
14. gün	4	191,25±8,69	4	207,25±22,64	0,173

* p<0,05

Tablo 4.2. TFP grubundaki deneklerin ağırlık değişim bulguları.

	T0		T1		
TFP Grubu	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
1. gün	4	184,25±16,39	4	180,00±15,59	0,007*
3. gün	4	188,00±41,34	4	192,00±37,95	0,449
7. gün	4	188,50±9,57	4	204,25±11,61	0,004*
14. gün	4	201,25±11,02	4	233,75±9,53	0,006*

* p<0,05

Tablo 4.3. TZP grubundaki deneklerin ağırlık değişim bulguları.

	T0		T1		
TZP Grubu	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
1. gün	4	149,25±36,06	4	145,00±34,97	0,007*
3. gün	4	163,25±18,19	4	162,00±18,38	0,504
7. gün	4	174,25±33,86	4	181,75±29,54	0,063
14. gün	4	196,75±48,13	4	224,00±38,67	0,031*

* p<0,05

4.3. M1-I mesafesi Ölçümlerindeki Güvenirlik

3 kez tekrarlanan ölçümlerdeki sınıf içi güvenirlilik katsayısı 0,9491 olarak bulunmuştur.

4.4. Ortodontik Diş Hareketinin Metrik Ölçüm Bulguları

Tablo 4.4. Kontrol grubu deneklerde 1, 3, 7, 14. günlerde deney (sağ), kontrol (sol) taraflarında ölçülen diş hareket miktarları ve bu değerlerin birbirinden çıkarılması ile elde edilen M1'in saf mezializasyon miktarı.

Kontrol grubu	D ($\bar{x} \pm ss$)	K ($\bar{x} \pm ss$)	S ($\bar{x} \pm ss$)
1. gün	0,5375 $\pm$ 0,0478	0,0750 $\pm$ 0,0500	0,4625 $\pm$ 0,9465
3. gün	0,7250 $\pm$ 0,0288	0,1000 $\pm$ 0,0000	0,6250 $\pm$ 0,0288
7. gün	0,8625 $\pm$ 0,3275	0,3125 $\pm$ 0,1784	0,5500 $\pm$ 0,2405
14. gün	1,2350 $\pm$ 0,2573	0,5200 $\pm$ 0,1913	0,7150 $\pm$ 0,2982

D: Ortodontik kuvvet uygulanan deney tarafı (sağ) M1-I mesafesindeki azalma miktarı (mm), K: Ortodontik kuvvet uygulanmayan kontrol tarafı (sol) M1-I mesafesindeki azalma miktarı (mm), S: M1'in saf mezializasyon miktarı (D-K)

Tablo 4.5. TFP grubu deneklerde 1, 3, 7, 14. günlerde deney (sağ), kontrol (sol) taraflarında ölçülen diş hareket miktarları ve bu değerlerin birbirinden çıkarılması ile elde edilen M1'in saf mezializasyon miktarı.

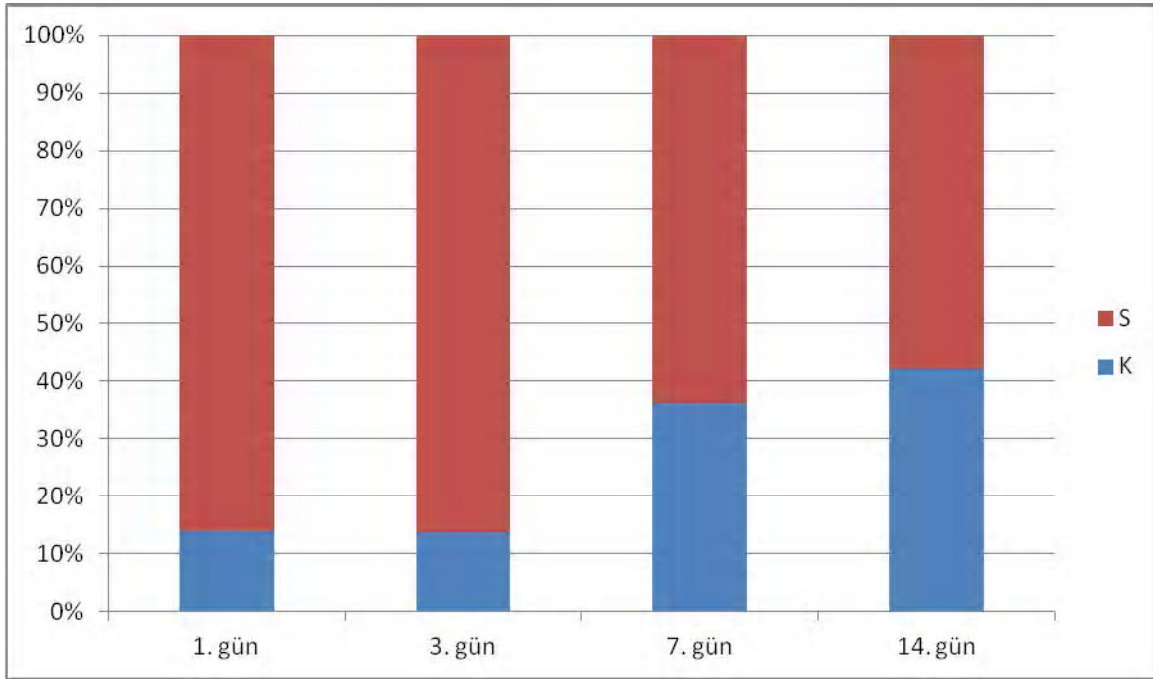
TFP grubu	D ($\bar{x} \pm ss$)	K ($\bar{x} \pm ss$)	S ($\bar{x} \pm ss$)
1. gün	0,4950 $\pm$ 0,1873	0,1600 $\pm$ 0,1451	0,3350 $\pm$ 0,0818
3. gün	0,6425 $\pm$ 0,1178	0,1600 $\pm$ 0,0711	0,4825 $\pm$ 0,1286
7. gün	0,7325 $\pm$ 0,2820	0,2650 $\pm$ 0,1799	0,4675 $\pm$ 0,1820
14. gün	0,9825 $\pm$ 0,0987	0,4950 $\pm$ 0,0331	0,4875 $\pm$ 0,1135

D: Ortodontik kuvvet uygulanan deney tarafı (sağ) M1-I mesafesindeki azalma miktarı (mm), K: Ortodontik kuvvet uygulanmayan kontrol tarafı (sol) M1-I mesafesindeki azalma miktarı (mm), S: M1'in saf mezializasyon miktarı (D-K)

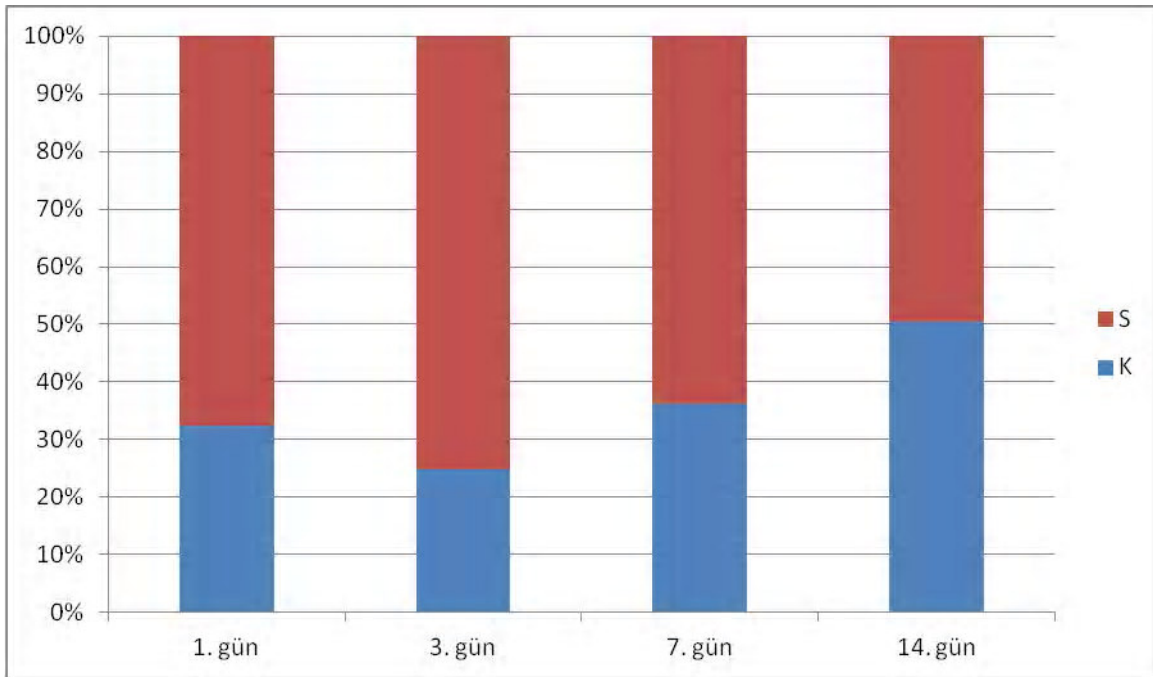
Tablo 4.6. TZP grubu deneklerde 1, 3, 7, 14. günlerde deney (sağ), kontrol (sol) taraflarında ölçülen diş hareket miktarları ve bu değerlerin birbirinden çıkarılması ile elde edilen M1'in saf mezializasyon miktarı.

TZP grubu	D ($\bar{x} \pm ss$)	K ($\bar{x} \pm ss$)	S ($\bar{x} \pm ss$)
1. gün	0,3675 $\pm$ 0,1043	0,0800 $\pm$ 0,0489	0,2875 $\pm$ 0,1225
3. gün	0,5250 $\pm$ 0,1170	0,2375 $\pm$ 0,2698	0,2875 $\pm$ 0,1767
7. gün	0,6875 $\pm$ 0,4090	0,4050 $\pm$ 0,0602	0,2825 $\pm$ 0,4239
14. gün	0,9000 $\pm$ 0,1435	0,6075 $\pm$ 0,0556	0,2925 $\pm$ 0,1284

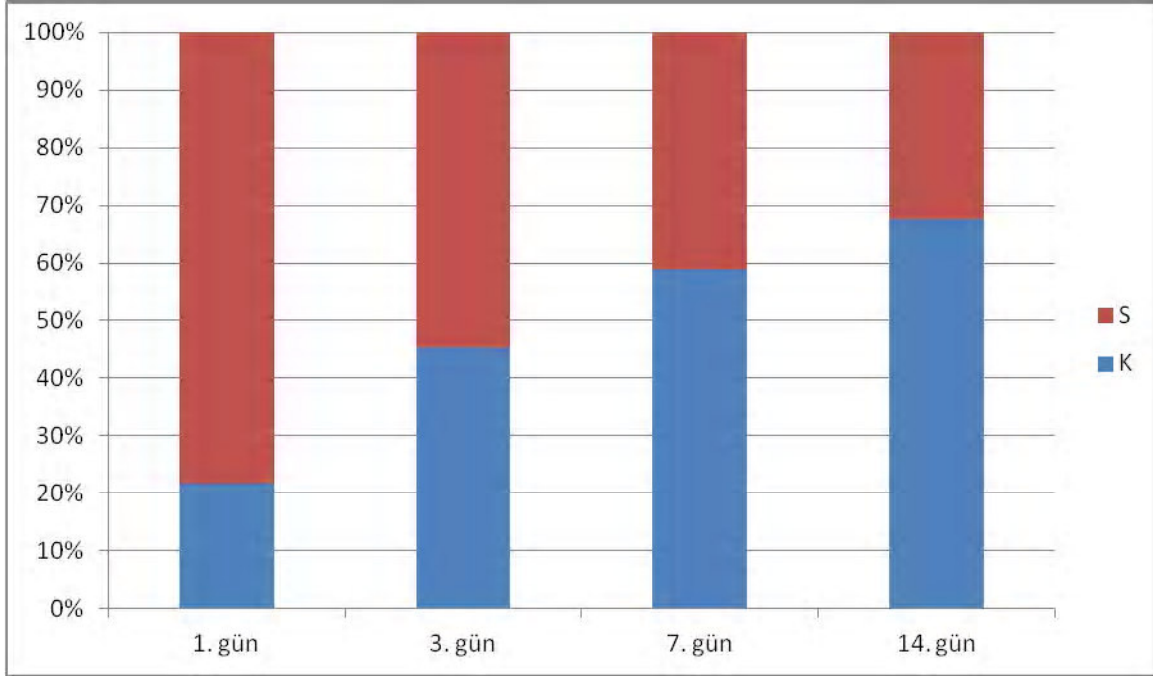
D: Ortodontik kuvvet uygulanan deney tarafı (sağ) M1-I mesafesindeki azalma miktarı (mm), K: Ortodontik kuvvet uygulanmayan kontrol tarafı (sol) M1-I mesafesindeki azalma miktarı (mm), S: M1'in saf mezializasyon miktarı (D-K)



Şekil 4.1. Kontrol grubu 1-14. günlerdeki M1 saf mezializasyon ve keser eğilme miktarlarının grafiksel gösterimi, K:Keser eğilme miktarı (mm), S: M1'in saf mezializasyon miktarı.



Şekil 4.2. TFP grubu 1-14. günlerdeki M1 saf mezializasyon ve keser eğilme miktarlarının grafiksel gösterimi, K:Keser eğilme miktarı (mm), S: M1'in saf mezializasyon miktarı.



Şekil 4.3. T2P grubu 1-14. günlerdeki M1 saf mezializasyon ve keser eğilme miktarlarının grafiksel gösterimi, K:Keser eğilme miktarı (mm), S: M1'in saf mezializasyon miktarı.

4.5. M1'in Saf Mezializasyon Miktarının Grup İçi Ve Gruplar Arası Kıyaslanması

Saf mezializasyon miktarı grup içi karşılaştırmada 1, 3, 7, 14. günler arası tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir. (Tablo 4.7, 4.8, 4.9) ($p < 0,05$)

Gruplar arası karşılaştırmada ise saf mezializasyon miktarı 1 ve 7. günlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermezken; hem 3 hem de 14. günlerde saf mezializasyon miktarı TZP grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede az bulunmuştur. (Tablo 4.10) ($p < 0,05$)

Tablo 4.7. Kontrol grubu saf mezializasyon miktarı değerlerinin 1- 14. günler arası grup içi karşılaştırmaları.

Kontrol grubu	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$
1. gün	4	0,463±0,0946
3. gün	4	0,625±0,0289
7. gün	4	0,550±0,241
14. gün	4	0,715±0,298
<i>p</i>		0,358

Tablo 4.8. TFP grubu saf mezializasyon miktarı değerlerinin 1- 14. günler arası grup içi karşılaştırmaları.

TFP grubu	<i>n</i>	Medyan (%25- %75)
1. gün	4	0,355 (0,270-0,400)
3. gün	4	0,515 (0,400-0,565)
7. gün	4	0,535 (0,355-0,580)
14. gün	4	0,510 (0,415-0,560)
<i>p</i>		0,340

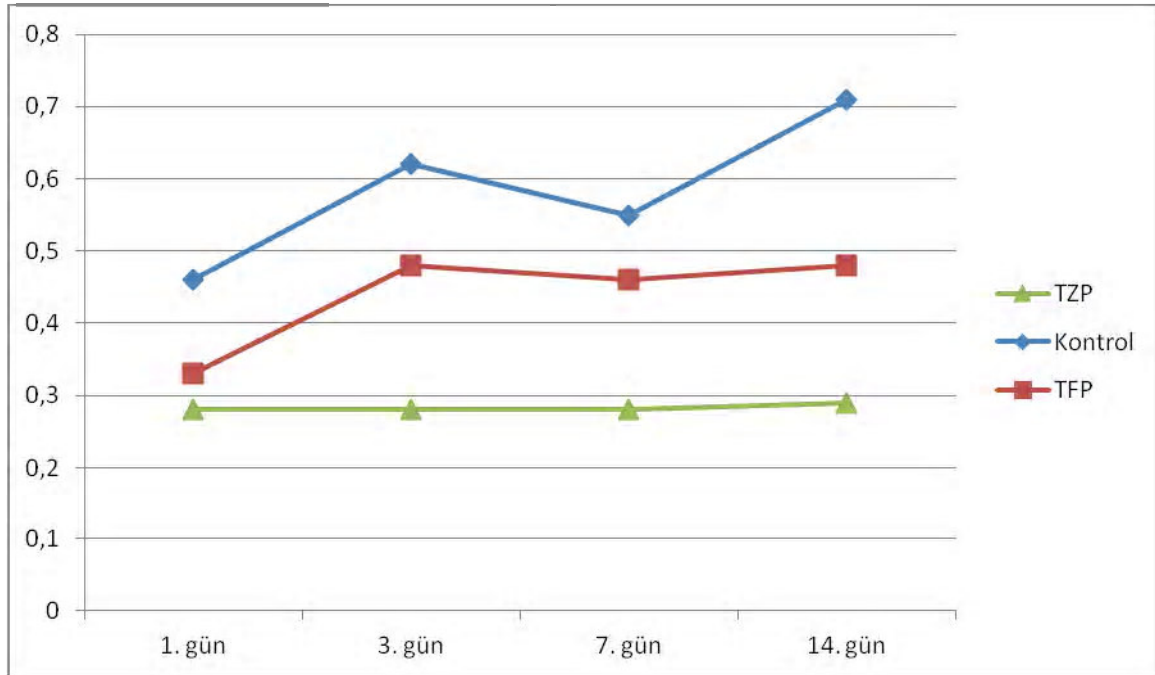
Tablo 4.9. TZP grubu saf mezializasyon miktarı değerlerinin 1- 14. günler arası grup içi karşılaştırmaları.

TZP grubu	<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$
1. gün	4	0,288±0,123
3. gün	4	0,287±0,177
7. gün	4	0,282±0,424
14. gün	4	0,292±0,128
<i>p</i>		1,00

Tablo 4.10. M1'in saf mezializasyon miktarı değerlerinin kontrol, TZP ve TFP grupları arası karşılaştırmaları.

Alt gruplar		<i>n</i>	$\bar{x} \pm ss$	<i>P</i>
1. gün	Kontrol	4	0,4625±0,09465	0,089
	TZP	4	0,2875±0,12258	
	TFP	4	0,3350±0,08185	
3. gün	Kontrol	4	0,6250±0,02887 ^a	0,014 [*]
	TZP	4	0,2875±0,17671 ^b	
	TFP	4	0,4825±0,12868 ^{ab}	
7. gün	Kontrol	4	0,5500±0,24055	0,466
	TZP	4	0,2825±0,42398	
	TFP	4	0,4675±0,18209	
14. gün	Kontrol	4	0,7150±0,29827 ^a	0,043 [*]
	TZP	4	0,2925±0,12842 ^b	
	TFP	4	0,4875±0,11354 ^{ab}	

* p<0,05



Şekil 4.4. Kontrol, TFP ve TZP gruplarındaki saf mezializasyon miktarlarının grafiksel gösterimi.

4.6. Periyodontal Ligament Aralığı Mesafesi Ölçüm Bulgularının Grup İçi Ve Gruplar Arası Kıyaslanması

Kontrol grubundaki ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş sıkışan taraf PDL genişliği 1, 3 ve 7. günler arası istatistiksel olarak farklılık göstermezken, 14. gündeki PDL genişliği istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. TFP ve TZP gruplarında ise 1, 3 ve 7. günlerdeki PDL genişliği birbirinden anlamlı derecede farklılık gösterirken, 7 ve 14. günler arasındaki PDL genişliğindeki artış istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir. (Tablo 4.11) ($p < 0,05$)

Gruplar arası karşılaştırmada 1. gün her üç grup arasında fark gözlenmezken, 3 ve 7. günlerde sıkışan taraf PDL mesafesi, kontrol grubunda diğer gruplara göre daha az bulunmuştur. 14. günde ise istatistiksel olarak anlamlı fark sadece kontrol ve TFP grupları arasındadır. (Tablo 4.12)

Tablo 4.11. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş sıkışan taraf PDL genişliği değişimlerinin 1- 14. günler arası karşılaştırmaları.

	1. gün $\bar{x} \pm ss$	3. gün $\bar{x} \pm ss$	7. gün $\bar{x} \pm ss$	14.gün $\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
K sağ	77,85 ± 28,02 ^a	78,01 ± 10,45 ^a	102,78 ± 14,64 ^a	154,43 ± 23,27 ^b	0,001 [*]
TFP sağ	89,79 ± 14,00 ^a	153,30 ± 20,21 ^b	187,92 ± 11,30 ^c	203,74 ± 22,79 ^c	0,001 [*]
TZP sağ	105,36 ± 20,43 ^a	140,55 ± 1,60 ^b	189,08 ± 16,66 ^c	189,48 ± 7,06 ^c	0,001 [*]

Ortak harf paylaşımı benzerliği gösterirken, ortak harf paylaşmayanlar farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) ifade eder, * p<0,05.

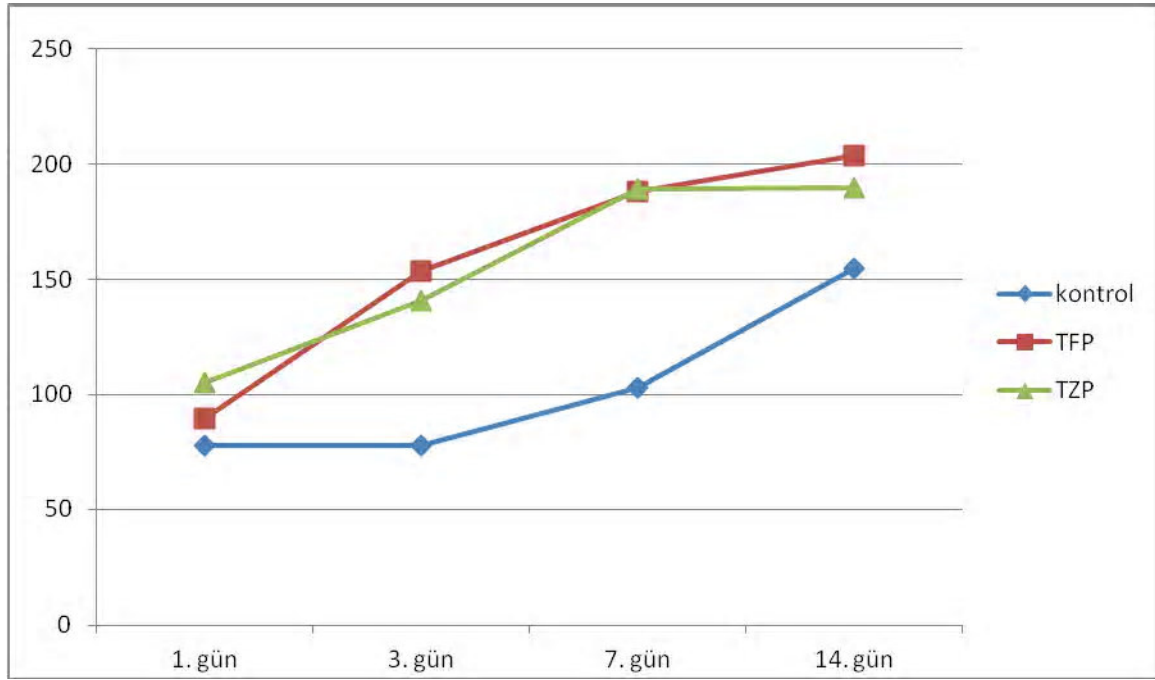
a,b harflendirme sistemi grup içi karşılaştırmalar için yapılmıştır.

Tablo 4.12. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş sıkışan taraf PDL genişliği değişimlerinin kontrol, TFP ve TZP grupları arası karşılaştırılması.

	Kontrol sağ $\bar{x} \pm ss$	TFP sağ $\bar{x} \pm ss$	TZP sağ $\bar{x} \pm ss$	<i>P</i>
1. gün	77,85 ± 28,02	89,79 ± 14,00	105,36 ± 20,43	0,248
3. gün	78,01 ± 10,45 ^a	153,30 ± 20,21 ^b	140,55 ± 1,60 ^b	<0,001 [*]
7. gün	102,78 ± 14,64 ^a	187,92 ± 11,30 ^b	189,08 ± 16,66 ^b	<0,001 [*]
14. gün	154,43 ± 23,27 ^a	203,74 ± 22,79 ^b	189,48 ± 7,06 ^{ab}	0,033 [*]

Ortak harf paylaşımı benzerliği gösterirken, ortak harf paylaşmayanlar farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) ifade eder, * p<0,05.

a,b harflendirme sistemi gruplar arası karşılaştırmalar için yapılmıştır.



Şekil 4.5. Sıkışan taraf PDL genişliği mesafesinin günlere göre değişimi (mikrometre/gün).

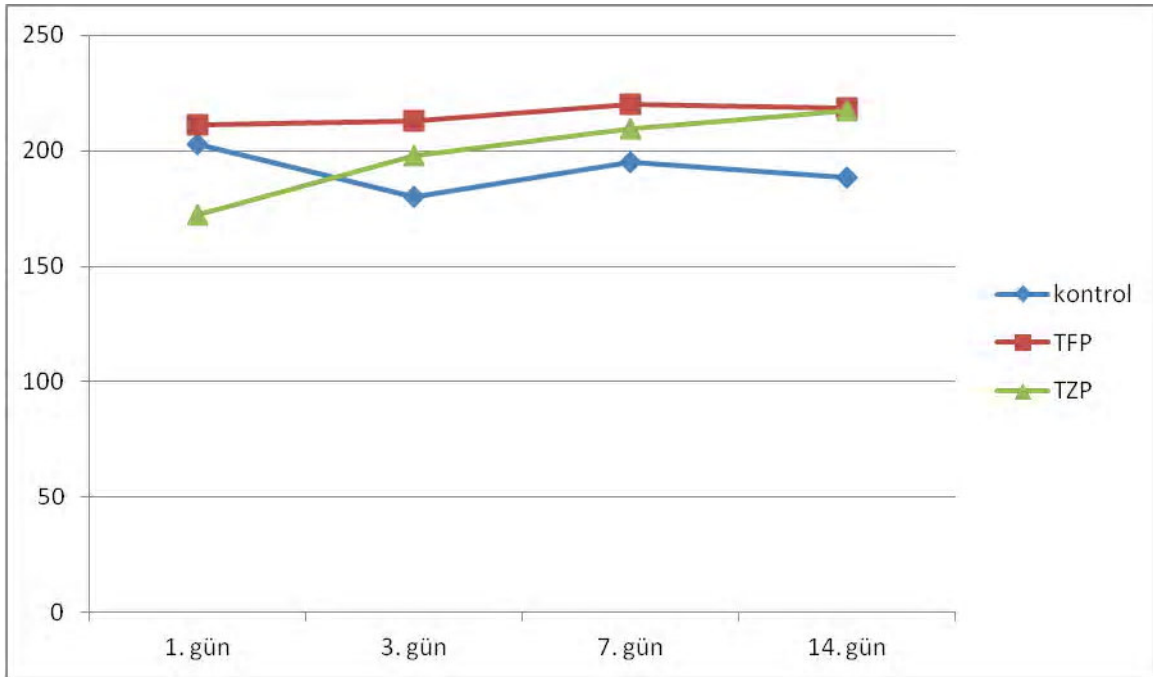
Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL genişliği, tüm gruplarda, grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). (Tablo 4.13, 4.14)

Tablo 4.13. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL genişliği değişimlerinin 1- 14. günler arası karşılaştırmaları.

	1. gün $\bar{x} \pm ss$	3. gün $\bar{x} \pm ss$	7. gün $\bar{x} \pm ss$	14.gün $\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
K sağ	202,90 ± 35,92	180,19 ± 13,64	194,91 ± 44,16	188,46 ± 31,35	0,799
TFP sağ	211,28 ± 14,41	212,58 ± 15,86	220,26 ± 14,72	218,46 ± 23,42	0,861
TZP sağ	172,41 ± 13,50	197,95 ± 1,94	209,29 ± 22,19	217,53 ± 10,62	0,114

Tablo 4.14. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL genişliği değişimlerinin kontrol, TFP ve TZP grupları arası karşılaştırılması.

	Kontrol sağ $\bar{x} \pm ss$	TFP sağ $\bar{x} \pm ss$	TZP sağ $\bar{x} \pm ss$	<i>P</i>
1. gün	202,90 ± 35,92	211,28 ± 14,41	172,41 ± 13,50	0,101
3. gün	180,19 ± 13,64	212,58 ± 15,86	197,95 ± 1,94	0,050
7. gün	194,91 ± 44,16	220,26 ± 14,72	209,29 ± 22,19	0,509
14. gün	188,46 ± 31,35	218,46 ± 23,42	217,53 ± 10,62	0,248



Şekil 4.6. Gerilim tarafı PDL genişliği mesafesinin günlere göre değişimi (mikrometre/gün).

4.7. Osteoblast Sayısı Bulgularının Grup İçi Ve Gruplar Arası Kıyaslanması

Sadece enjeksiyon yapılan ve ortodontik kuvvetle birlikte enjeksiyon yapılan gruplar arası karşılaştırmada, maksiller 1. molar diş distal kökünün distal PDL bölgesindeki osteoblast sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$) (Tablo 4.15)

Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki osteoblast sayıları arasında, kontrol ve TFP gruplarında, 1- 14. günler arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. TZP grubunda ise 14. günde aktif osteoblast sayısı diğer günlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. (Tablo 4.16)

Ayrıca gruplar arası karşılaştırmada 1, 3, 7. günlerde 3 grup arasında fark bulunmazken, 14. gün TZP grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. 14. günde TZP grubunda gerilim tarafı aktif osteoblast sayısı diğer gruplara kıyasla daha az bulunmuştur. (Tablo 4.17)

Tablo 4.15. Sağ ve sol M1 distal PDL bölgelerindeki osteoblast sayılarının gruplar arası karşılaştırılması.

Osteoblast Sayıları	1. gün $\bar{x} \pm ss$	3. gün $\bar{x} \pm ss$	7. gün $\bar{x} \pm ss$	14. gün $\bar{x} \pm ss$
Kontrol sağ	28,75±7,13	44,75±20,59	39,25±19,25	34±11,10
Kontrol sol	36,66±14,29	42,25±8,99	46,75±13,37	45,33±6,50
TFP sağ	30,25±9,46	39±9,84	31,25±14,93	38,75±8,99
TFP sol	34,5±6,95	34,5±6,95	34,25±10,11	29,5±14,27
TZP sağ	21,75±8,53	34,33±16,50	33,75±11,92	17,5±4,95
TZP sol	31,25±13,32	30,25±8,65	26,25±6,99	30±7,07
<i>p</i>	0,407	0,684	0,360	0,085

Tablo 4.16. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki osteoblast sayılarının 1- 14. günler arası karşılaştırmaları.

	1. gün $\bar{x} \pm ss$	3. gün $\bar{x} \pm ss$	7. gün $\bar{x} \pm ss$	14.gün $\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
K sağ	28,75 ± 7,13	44,75 ± 20,59	39,25 ± 19,25	34,00 ± 11,10	0,527
TFP sağ	30,25 ± 9,46	39,00 ± 9,46	31,25 ± 14,93	38,75 ± 8,99	0,593
TZP sağ	21,75 ± 8,53 ^a	34,33 ± 16,50 ^a	33,75 ± 11,92 ^a	13,33 ± 8,02 ^b	0,043 [*]

Ortak harf paylaşımı benzerliği gösterirken, ortak harf paylaşmayanlar farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) ifade eder, * $p<0,05$.

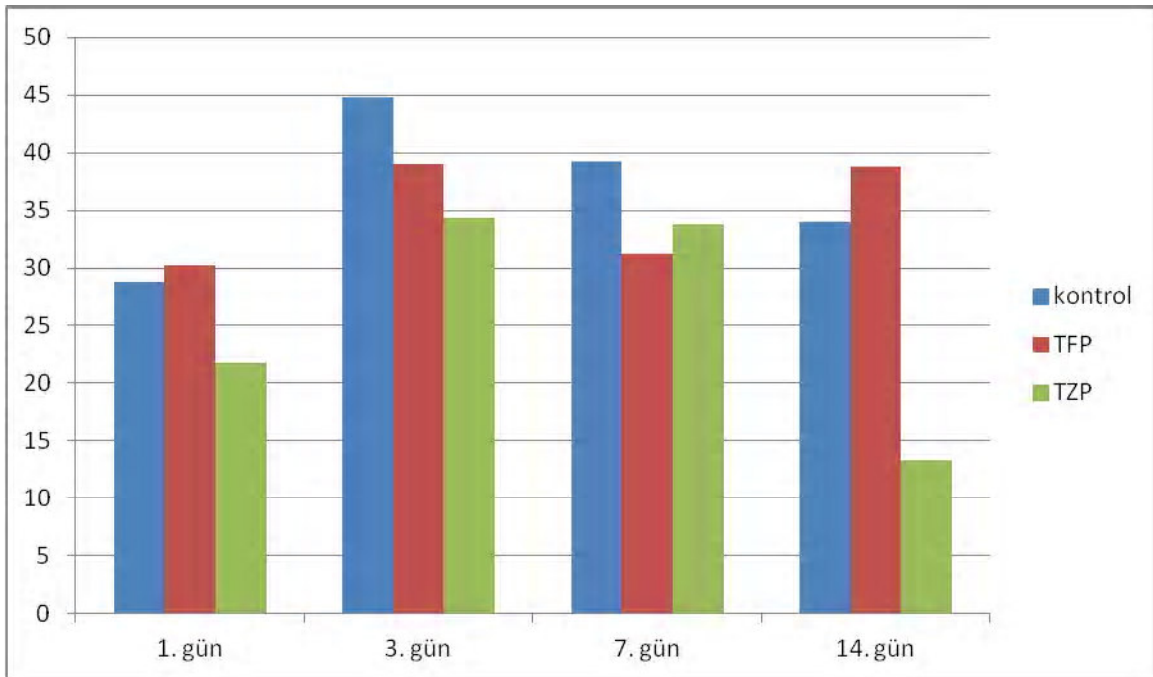
a,b harflendirme sistemi grup içi karşılaştırmalar için yapılmıştır.

Tablo 4.17. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki osteoblast sayılarının kontrol, TZP ve TFP grupları arası karşılaştırmaları.

	Kontrol sağ $\bar{x} \pm ss$	TFP sağ $\bar{x} \pm ss$	TZP sağ $\bar{x} \pm ss$	P
1. gün	28,75 ± 7,13	30,25 ± 9,46	21,75 ± 8,53	0,357
3. gün	44,75 ± 20,59	29,25 ± 21,09	34,33 ± 16,50	0,557
7. gün	39,25 ± 19,25	29,25 ± 11,08	33,75 ± 11,92	0,638
14. gün	34,00 ± 11,10 ^a	38,75 ± 8,99 ^a	13,33 ± 8,02 ^b	0,021 [*]

Ortak harf paylaşımı benzerliği gösterirken, ortak harf paylaşmayanlar farklılığı (istatistiksel olarak anlamlılığı) ifade eder, * p<0,05.

a,b harflendirme sistemi gruplar arası karşılaştırmalar için yapılmıştır.



Şekil 4.7. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş gerilim tarafı PDL bölgesindeki aktif osteoblast sayısının 1-14 günler arası değişiminin grafiksel gösterimi.

4.8. Osteoklast Sayısı Bulgularının Grup İçi Ve Gruplar Arası Kıyaslanması

Sadece enjeksiyon yapılan sağ taraf ve ortodontik kuvvetle birlikte enjeksiyon yapılan M1 distal kök mezial PDL bölgesindeki osteoklast sayıları karşılaştırıldığında ne grup içi ne de gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$) (Tablo 4.18)

Ortodontik kuvvet uygulanan deney tarafında grup içi 1, 3, 7, 14. günlerde ve gruplar arası karşılaştırmada osteoklast sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$) (Tablo 4.19 ve Tablo 4.20)

Tablo 4.18. Sağ ve sol M1 mezial PDL bölgelerindeki osteoklast sayılarının gruplar arası karşılaştırılması.

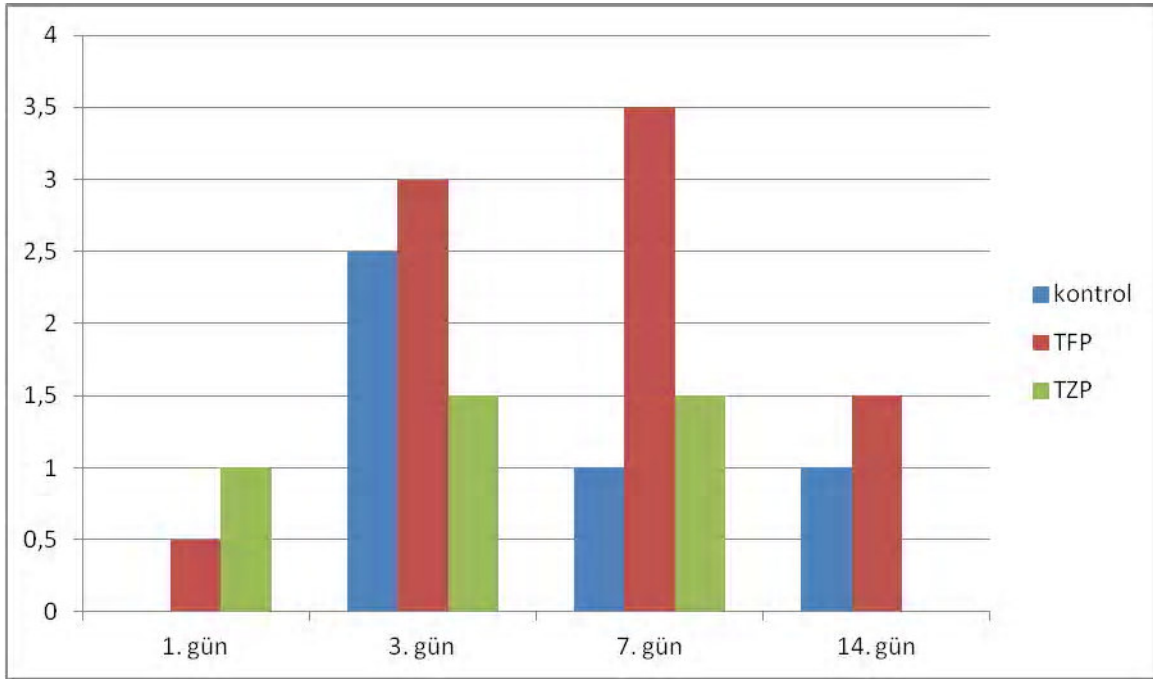
Osteoklast Sayıları	N	1. gün	3. gün	7. gün	14. gün
		<i>Medyan</i> (%25- %75)	<i>Medyan</i> (%25- %75)	<i>Medyan</i> (%25- %75)	<i>Medyan</i> (%25- %75)
Kontrol sağ	4	0,000 (0,000-0,500)	2,500 (2,000-4,500)	1,000 (0,000-2,500)	1,000 (0,000-3,500)
Kontrol sol	4	1,500 (1,000-2,000)	2,000 (1,000-3,000)	1,000 (0,500-1,500)	1,500 (1,000-2,000)
TFP sağ	4	0,500 (0,000-1,500)	3,000 (0,000-7,000)	5,500 (3,000-6,000)	1,500 (0,500-2,500)
TFP sol	4	0,500 (0,000-1,000)	0,500 (0,000-1,500)	1,000 (0,000-2,000)	0,500 (0,000-1,500)
TZP sağ	4	1,000 (0,500-2,000)	1,500 (0,500-3,500)	1,500 (0,500-3,000)	0,000 (0,000-1,500)
TZP sol	4	0,000 (0,000-0,500)	0,000 (0,000-0,500)	0,000 (0,000-0,000)	0,500 (0,000-1,000)
<i>p</i>		0,154	0,203	0,158	0,498

Tablo 4.19. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar dış basınç tarafı PDL bölgesindeki osteoklast sayılarının 1- 14. günler arası grup içi karşılaştırmaları.

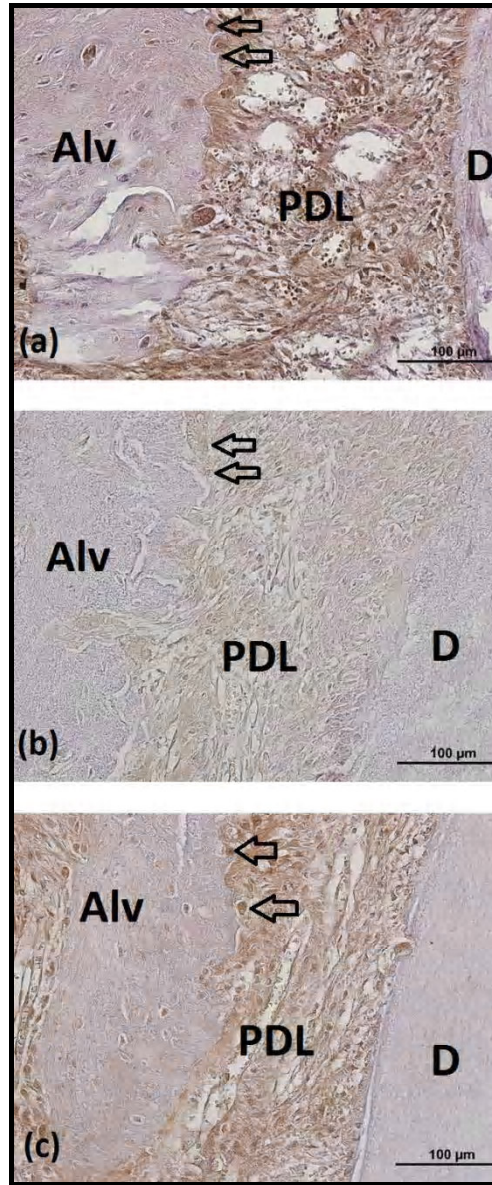
	1. gün $\bar{x} \pm ss$	3. gün $\bar{x} \pm ss$	7. gün $\bar{x} \pm ss$	14. gün $\bar{x} \pm ss$	<i>p</i>
K sağ	0,25 $\pm$ 0,50	3,25 $\pm$ 1,89	1,25 $\pm$ 1,50	1,75 $\pm$ 2,36	0,148
TFP sağ	0,75 $\pm$ 0,95	3,50 $\pm$ 4,12	4,50 $\pm$ 2,38	1,50 $\pm$ 1,29	0,182
TZP sağ	1,25 $\pm$ 1,25	2,00 $\pm$ 2,16	1,75 $\pm$ 1,70	0,50 $\pm$ 1,00	0,576

Tablo 4.20. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş basınç tarafı PDL bölgesindeki osteoklast sayılarının kontrol, TZP ve TFP grupları arası karşılaştırmaları.

Osteoklast Sayıları	<i>n</i>	K sağ	TFP sağ	TZP sağ	<i>p</i>
		<i>Medyan</i> (%25- %75)	<i>Medyan</i> (%25- %75)	<i>Medyan</i> (%25- %75)	
1. gün	4	0,000 (0,000-0,500)	0,500 (0,000-1,500)	1,000 (0,500-2,000)	0,452
3. gün	4	2,500 (2,000-4,500)	3,000 (0,000-7,000)	1,500 (0,500-3,500)	0,667
7. gün	4	1,000 (0,000-2,500)	3,500 (1,500-5,500)	1,500 (0,500-3,000)	0,348
14. gün	4	1,000 (0,000-3,500)	1,500 (0,500-2,500)	0,000 (0,000-1,000)	0,557

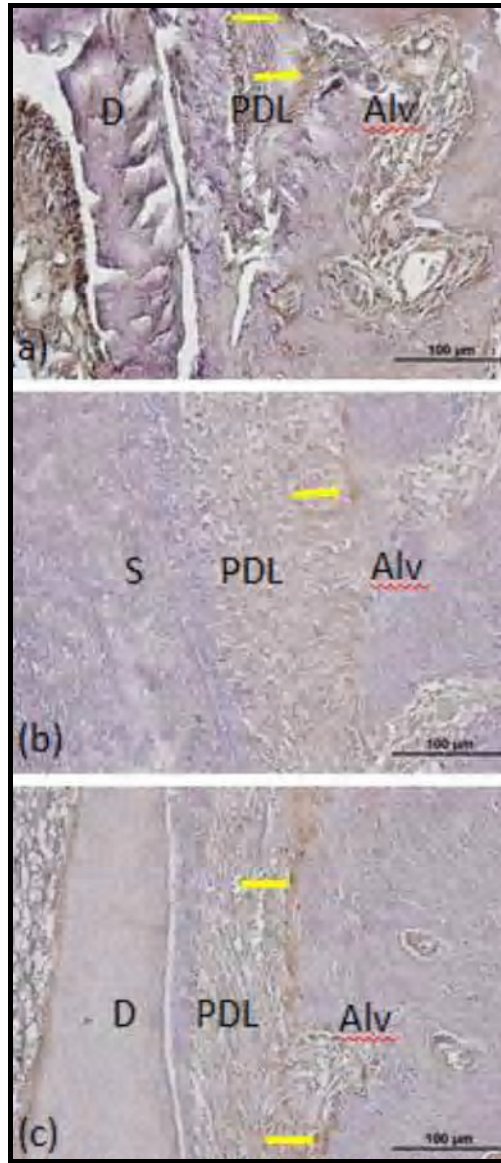


Şekil 4.8. Ortodontik kuvvet uygulanan maksiller 1. molar diş basınç tarafı PDL bölgesindeki aktif osteoklast sayısının 1-14 günlerde gruplar arası karşılaştırılması.



Şekil 4.9. ×40 büyütmede osteoblast hücre sayımı için alkalen fosfataz primer antikoru ile immunohistokimya metodu ile boyanmış preparatlar. ok: alveoler kemik yüzeyi boyunca dizilim gösteren osteoblast hücreleri.

- a: Kontrol grubu 1. gün, sağ 1. Molar diş distal kök, gerilim taraf PDL bölgesi
- b: TFP grubu 1. gün, sağ 1. Molar diş distal kök, gerilim taraf PDL bölgesi
- c: TZP grubu 1. gün, sağ 1. Molar diş distal kök, gerilim taraf PDL bölgesi



Şekil 4.10. $\times 40$ büyütmede osteoklast hücre sayımı için TRAP primer antikoru ile immunohistokimya metodu ile boyanmış preparatlar. Sarı ok: alveoler kemik yüzeyi boyunca dizilim gösteren osteoklast hücreleri.

- a: Kontrol grubu 1. gün, sağ 1. Molar diş distal kök, basınç taraf PDL bölgesi
 b: TFP grubu 1. gün, sağ 1. Molar diş distal kök, basınç taraf PDL bölgesi
 c: TZP grubu 1. gün, sağ 1. Molar diş distal kök, basınç taraf PDL bölgesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Amaç

Ortodontik tedavilerde hedeflenen diş hareketlerinin sağlanması kemiğin remodeling süreci yüzünden uzun zaman almakta, dolayısıyla tedavi süresi uzamaktadır. Bu nedenle ortodontik diş hareket hızını arttırıcı yöntemler günümüzde hala popülerliğini koruyan konulardan biridir. Literatürdeki mevcut yöntemlerin büyük kısmı bazı dezavantajlara sahip olmalarından dolayı yapılan çalışmalar ile etkili, hasta için konforlu, uygulanması kolay ve maliyeti düşük yeni yöntem arayışları devam etmektedir.

TZP uygulaması, tıp ve diş hekimliğinin çeşitli dallarında kullanılan, elde edilmesi kolay, maliyeti düşük ve otojen olduğu için kullanımı güvenli bir yöntemdir. Özellikle dermatoloji ve ortopedi olmak üzere birçok tıp dalında TZP enjeksiyonları yaygın olarak uygulanmaktadır. Ancak diş hekimliğindeki kullanım alanı daha çok TZP'nın kemik defektlerinde tek başına jel olarak veya greft materyalleri ile birlikte kullanıldığı çalışmalar ile sınırlı kalmıştır (47, 58, 85-90).

Oysa yapılan literatür taramasında, mekanik yükleme sonucu, hem gerilim hem basınç tarafında, PDL ve alveoler kemik remodelinginde görev alan çok sayıda büyüme faktörünün, ortodontik diş hareketinin erken safhalarında, bölgedeki çeşitli hücrelerden lokal olarak eksprese olduğunu vurgulayan yayınlara da rastlanılmıştır.

Osteoblast ve osteoklast hücreleri VEGF reseptör-1 eksprese ettiğinden bazı çalışmalar mekanik yükleme altında VEGF'in kemik remodelingi üzerindeki etkisini araştırmıştır (91, 92). İn vitro çalışmalar, PDL hücreleri ve apoptotik osteositlerin, sıkıştırıcı kuvvet uygulandıktan sonra VEGF sentezini arttırdığını göstermiştir (91, 92). VEGF osteoklast

prekürsörlerin aktivasyonunu, diferansiyasyonunu ve bir araya toplanmalarını düzenleyerek kemik rezorbsiyonunu artırır (93). 1999'da yapılan hayvan çalışmasında rhVEGF'ün tek doz enjeksiyonunun osteoporotik farelerde kemik rezorbsiyonu sırasında osteoklastların bir araya toplanmalarını arttırdığı bulunmuştur (93). Ayrıca indirekt olarak da kemik rezorbsiyonunu indükler; VEGF anjiyogenezi stimüle ederek oluşan yeni kapillerlerden osteoklast prekürsörlerin rezorbsiyon bölgesine geçişini ve bölgeye toplanmasını sağlar (92). VEGF'in, osteoklastların bir araya toplanmasını ve ortodontik diş hareketi oranını arttırmasıyla uyumlu olarak (7), anti-VEGF polyclonal antibody bu ikisini inhibe eder (94). Ayrıca farelerde ortodontik diş hareketinden 10 gün sonra gerilim tarafındaki PDL'teki fibroblast, osteosit ve osteoblastlarda VEGF ekspresyonu tespit edilmiştir (7). Buradan hareketle VEGF'in ortodontik diş hareketi boyunca hem basınç hem de gerilim bölgelerindeki kemik remodelinginde önemli rol oynadığı sonucuna ulaşılabilir (9).

TGF- β ortodontik diş hareketi sırasındaki PDL ve kemik doku remodelingi ile ilişkili bir başka büyüme faktörüdür (9). İn vitro olarak, mekanik yükleme altında oluşan gerilim kuvveti, osteoblastlardaki ve PDL hücrelerindeki TGF- β ekspresyonunu artırır (95). Ayrıca TGF- β , OPG üretimini stimüle ederken, IL-6 ekspresyonunu baskılar (95). Bununla uyumlu olarak Wistar cinsi sıçanlarda ortodontik diş hareketi uygulandıktan 2 gün sonra gerilim tarafındaki PDL hücrelerinde ve osteoblastlarda artmış OPG ve TGF- β mRNA seviyeleri tespit edilmiştir (96). İnsanda ise hızlı maksiller genişletme ve kanin distalizasyonu sırasında, sürekli kuvvet uygulanmasından birkaç gün sonra dişeti oluğu sıvısında ve PDL'te TGF- β seviyelerinin arttığı (97), ancak basınç ve gerilim tarafında TGF- β seviyeleri bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir (98).

Kemik morfogenetik proteinleri (Bone morphogenetic protein, BMP), TGF- β superfamilyasına ait multifonksiyonel büyüme faktörleridir. Bugüne kadar 20 BMP bulunmuştur, ancak en güçlü osteojenik aktiviteye sahip olanları BMP-2, BMP-6, BMP-7 ve BMP-9 olarak görünmektedir (99, 100). Çalışmalar gerilim kuvveti altında, kültürdeki PDL hücrelerinde BMP-2 ve BMP-6 ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir (99, 101). Bu nedenle BMP'lerin ortodontik diş hareketi sırasında gerilim bölgesinde önemli rol oynayabileceği savunulmuştur (99, 101). Ancak bu konuda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (Insulin-like growth factors, IGFs), osteoblast hücrelerinin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozunu indükleyerek, kemik formasyonunda görev alırlar (102). IGF etkisi, büyüme hormonu, paratiroid hormon, vitamin D3, kortikosteroidler,

TGF- β , IL-1 ve PDGF tarafından düzenlenir. Yapılan çalışmalarda, devamlı mekanik yükleme altında, sıçan tibia osteosit ve kalvaryal osteoblastlarında, kemik formasyonunu stimüle eden IGF-I sentezinin arttığı gösterilmiştir (103, 104). Ayrıca IGF, in vitro PDL'teki osteoblast ve fibroblast hücreleri için antiapoptik ve proliferatif faktör olarak davranır (105). Wistar cinsi sıçanlarda yapılan in vivo bir çalışmada, PDL hücrelerinde gerilim tarafında IGF-I ve IGF-I reseptörü ekspresyonunun arttığı, sıkışan tarafta ise azaldığı gösterilmiştir (106). Bu nedenle IGF-I'in lokal artışı, ortodontik diş hareketi sırasında gerilim tarafındaki remodeling ile ilişkili görünmektedir (9).

23 üyeye sahip fibroblast büyüme faktörleri (fibroblast growth factors, FGF) ailesinden FGF-2, in vitro osteoblast benzeri hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunu stimüle ederek ve osteoklast formasyonu ve aktivitesini arttırarak, kemik remodelingini düzenleyebilir (107). Yapılan çalışmada FGF-2'nin düşük konsantrasyonlarının olgun osteoklastları etkileyerek moderate, yüksek konsantrasyonlarının ise osteoblastları etkileyerek kuvvetli şekilde kemik rezorbsiyonunu indüklediği sonucuna ulaşılmıştır (107). Başka bir in vitro çalışmada, kompresif kuvvetlerin insan PDL hücrelerindeki FGF-2 üretimini indüklediği gösterilmiştir (108). Ayrıca in vivo insan PDL dokusunda da mekanik yüklemeden 1 gün sonra sıkışan tarafta bu büyüme faktörünün ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (109). Bulgular FGF-2'nin ortodontik diş hareketi sırasındaki kemik rezorbsiyonunda görev aldığını desteklemektedir (108, 109). Ancak FGF-2'nin mekanik yükleme sonrası gerilim tarafında etkili olup olmadığı henüz aydınlatılamamıştır. FGF-6, FGF-8, FGF-9, FGF-18 ve FGF-23 kemik hücre fonksiyonunu düzenleyici büyüme faktörleri olarak bilindiği için, bu büyüme faktörlerinin de ortodontik kuvvet uygulanması sonrası test edilmesi gerekmektedir (107-110).

Ortodontik kuvvet uygulandıktan 24 saat sonra insan dişeti oluğunda artmış seviyelerde tespit edilen bir diğer büyüme faktörü, trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü (PDEGF)'dür (97). Güncel bir çalışmada, sıçanlarda dişe komşu mukozaya uygulanan epidermal büyüme faktörü-lipozom'un, RANKL ekspresyonunu uyardığı ve bunun da sıkışan taraftaki PDL'te osteoklast sayısında, dolayısıyla diş hareketinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (111). Ayrıca sıçanlarda ve kedilerde yapılan hayvan çalışmalarında, PDL gerilim tarafında epidermal büyüme faktörü ve reseptörünün, osteoblast ve PDL fibroblastlarında ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (111, 112). Bu bulgular ışığında epidermal büyüme faktörünün, ortodontik diş hareketi sırasında hem gerilim hem basınç tarafında, mineralize ve non-mineralize ekstraselüler matriks remodelingine katıldığı söylenebilir (9).

2005 yılında tavşanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada (113), tavşan alt keser dişlerine uygulanan ortodontik kuvvet sonucu, 1, 3, 5, 7, 14 ve 21. günlerdeki PDGF-AA ekspresyonu immünohistokimyasal olarak araştırılmış ve ortodontik kuvvet uygulanan deney grubunda, kuvvet uygulanmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında PDGF-AA ekspresyonunda anlamlı derecede artış tespit edilmiştir. Deney grubundaki PDGF-AA seviyesi gerilim tarafında, basınç tarafındakinden fazla bulunmuştur.

Tüm bu literatür bilgisi büyüme faktörlerinin ortodontik diş hareketinin temelini oluşturan remodeling sürecinde rol oynadıklarını göstermektedir. Buna rağmen büyüme faktörlerinin ortodontik diş hareket hızına olan etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Kaku et al. ise 2001 yılında farelerde yaptıkları deneysel çalışmada rhVEGF'nin ortodontik diş hareketi sırasındaki osteoklast farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Lateral yönde kuvvet uyguladıkları keserlerin bukkal gingival oluşu çevresinde tek doz rhVEGF enjekte etmişler ve rhVEGF'nin lokal uygulanmasının osteoklast sayısını arttırdığını ve dolayısıyla ortodontik diş hareket oranını arttırdığını belirtmiştir (6).

Sıçanlarda diş hareketi ile birlikte 1. molar bukkal mukozadan lokal epidermal büyüme faktörü-lipozom uygulanması yapılan bir başka çalışmada, EGF-lipozom uygulanmasının kontrol ile kıyaslandığında diş hareket miktarında ve osteoklast sayısında artışa neden olduğu tespit edilmiştir (111).

Seifi et al. 2012 yılında sıçanlarda yaptıkları çalışmada mezial yönde 60 gr ortodontik kuvvet uyguladıkları 1. Molar dişlerin bukkaline değişik dozlarda bFGF (basic fibroblast growth factor) enjekte etmişler ve ortodontik diş hareket miktarına olan etkisini araştırmışlardır. Sonuçta kontrol gruplarıyla kıyaslandığında deney gruplarında ortodontik diş hareket oranı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (8).

Literatür taramasında tek tek izole büyüme faktörlerinin enjeksiyonu ile gerçekleştirilen bu çalışmalar yayında, tüm büyüme faktörlerinin birarada bulunduğu TZP ve TFP'nin ortodontik diş hareket hızına etkisini araştıran herhangi bir yayına rastlanılmamıştır. Bu nedenle; alfa granüllerinde çok çeşitli ve yüksek miktarda büyüme faktörü barındıran trombositlerin, konsantre halde bulunduğu TZP ve TZP'ya oranla çok daha az miktarlarda büyüme faktörü içeren TFP'nin, ortodontik diş hareketinin temelini oluşturan remodeling süreci üzerine etkisinin ortaya konulması hedeflenerek bu çalışma planlanmıştır.

5.2. Deney Hayvanlarının Seçimi

Ortodontik diş hareketi üzerine yapılan hayvan çalışmalarında maymun, kedi, köpek, kobay, tavşan gibi çeşitli hayvanların kullanılmasına karşın, kolay temin edilebilmeleri, ucuz olmaları, bakımlarının kolay olması gibi bazı avantajlarından dolayı daha çok sıçanlar tercih edilmektedir. Yapılan bir review sonucunda diş hareketi üzerine yapılan 320 hayvan çalışmasından 175'inin sıçanlar üzerinde yapıldığı tespit edilmiştir (114). Sıçan materyalin histolojik olarak çalışılması, diğer deney hayvanlarına göre, örneğin köpeğe daha kolaydır. Diğer önemli bir avantajı hücresel ve moleküler biyolojik teknikler için kullanılan birçok antikoru sadece sıçan ve farelerde kullanılabilir olmasıdır. Ayrıca transgenik soylar neredeyse sadece küçük kemirgenlerde üretilebilir. Fareler ortodontik aparatı yerleştirebilmek için çok küçük olduklarından, sıçanlar bu alanda kullanılabilecek ilk deney hayvanı seçeneğidir (114). Steigman et al. (115), sıçanlarda periodontal ligament ve alveol kemiğinde mekanik uyarılara karşı oluşan biyolojik yanıtın hücresel seviyede insandakine çok benzediğini ve daha hızlı geliştiğini bildirilmiştir. Storey et al. (19) ise, maymun ve kedi dokularının birçok özelliğinin insana çok benzediğini ancak ortodontik kuvvet uygulandıktan sonra meydana gelen değişikliklerin en iyi sıçanlarda takip edilebildiğini belirtmiştir. Bu nedenle bu çalışmada deney hayvanı olarak sıçanların kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak sıçanlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları yorumlanırken, periyodontal liflerin diziliminin farklı olması, kemik yapısının insandakinden daha dens olması, metabolizma hızlarının daha yüksek olması, kalsiyum dengesinin kemik dokudan çok intestinal absorpsiyonla kontrol edilmesi gibi farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır (114).

Hücre dışı uyarıların etkisini hücresel cevaba dönüştüren cAMP seviyesi genç sıçanlarda daha yüksektir (20). Ayrıca genç sıçanlarda periyodontal ligament ve alveol kemik hücreleri yüksek proliferatif aktivite gösterir. Yaşla birlikte PDL'deki organik matriks üretiminde, hücrelerin mitotik aktivitesinde ve çözünabilir kollojen miktarında azalma olduğu belirtilmektedir (116). Bununla beraber erişkin sıçanlarda periyontal aralık daha dar hale geldiğinden (117), dişe ortodontik kuvvet uygulandığında, basınç tarafında hiyalinize doku daha kolay oluşur (118). Bu da başlangıç diş hareketini geciktirir. Erişkin sıçanlarla kıyaslandığında genç sıçanlarda diş hareketi daha hızlıdır (20). Ayrıca 2010 yılında yapılan bir çalışmada (119), artan yaşla birlikte ligament fibroblastlarında, büyüme faktör reseptörü ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda genç olarak değerlendirilen 6-8 haftalık sıçanlar kullanılmıştır (120).

Östrojen hormonunun kemik metabolizması üzerindeki etkilerinin (121-123) elimine edilmesi için ise dişi yerine erkek sıçanlar tercih edilmiştir.

5.3. Deney Hayvan Sayısının Belirlenmesi

Hayvan deneylerinde kullanılmak üzere üretilen deneklerin fizyolojik olarak birbirlerine çok benzer olmaları ve bu nedenle uyaranlara çok benzer yanıt vermeleri nedeniyle, deney hayvan etik kurulları, çalışmalarda kullanılacak denek sayısının mümkün olduğunca az tutulmasını uygun görmektedir. Histokimyasal araştırmalarda değerlendirme yapılabilmesi için ise grup başına en az dört örnek bulunması gerekmektedir. Bunun yanında yapılan literatür taramasında benzer çalışmalarda da grup başına kullanılan denek sayısının benzer olduğu görülmüştür (82, 96, 124). Bu sebepten çalışma her alt grupta dört sıçan kullanılacak şekilde planlanmıştır.

5.4. Ortodontik Diş Hareketi Oluşturacak Mekanğin Seçimi

Sıçanlarda yapılan ortodontik diş hareketi çalışmalarında elastik rondeller (125), tellerden bükülerek hazırlanan zemberekler (126), simante edilen apareyler (127), kapalı yaylar (128) gibi çeşitli kuvvet elemanları kullanılmıştır. Bunlardan 1. ve 2. molar dişler arasına yerleştirilen elastik rondel yöntemi, uygulanmasının kolay olmasının yanında, kısa sürede kuvvetin ortadan kalkması ve lastiğin yerinden çıkma ihtimalinin yüksek olmasından dolayı tercih edilmemiştir. Kesici dişlere lateral yönde kuvvet uygulayan zemberekler ise premaksiller suturda açılma meydana getirecek yönde kuvvet uygulaması (19, 129) nedeniyle kullanılmamıştır. Ayrıca sıçanların kesici dişleri insanla kıyaslandığında tamamen farklı bir morfolojiye sahiptir. Bu nedenle sıçanlarda ortodontik diş hareket modeli olarak Brudvik ve Rygh'in (83) kullandığı 1. molar dişe mezial yönde kuvvet uygulayan kapalı yay dizaynı tercih edilmiştir. Molar dişlerin bukkal yönde hareketi yerine, mezial yönde hareketinin tercih edilmesindeki sebep ise; molar bölgedeki bukkal kemik miktarının yetersiz olması ve bukkal kemiğin mezial taraftaki kemikten daha kompakt olmasıdır (114). Bu bilgiye paralel olarak sıçanlarda yapılan çalışmaların %67'sinde mezial yönde diş hareketi tercih edilmiştir (114). Bu yöntemin dezavantajı uygulama sırasında palatal ve bukkal mukoza irritasyonuna neden olabilmesi ve keser dişlerdeki ligatürlerin hayvanlar tarafından çıkarılabilmesidir. Bu çalışmada da 1. molar dişlere ligatür uygulanması sırasında hafif düzeyde gingival ve mukozal irritasyon oluşmuştur. Ancak bu irritasyonların kısa sürede iyileştiği gözlenmiştir. Apareylerin çıkma veya kopma ihtimaline karşı ise kapalı yaylar keser dişlere ligatüre edildikten sonra ilave retansiyon önlemi olarak ligatürler, akıcı kompozit ile dişlere

tutturulmuştur. Ayrıca hayvanlar belli aralıklarla kontrol edilmiş, gerekli olanlara kompozit ilavesi yapılmıştır.

5.5. Uygun Kuvvet Miktarının Belirlenmesi

Hayvan çalışmalarında uygulanan ortodontik diş hareketi için kullanılan kuvvet miktarı 0,5 gr- 560 gr arasında değişmektedir (19, 82, 114, 130-133). Bununla birlikte optimal kuvvet büyüklüğü hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bazı yazarlar kuvvet büyüklüğü ile diş hareket miktarı arasında doğru orantı olduğunu, yani kuvvet miktarı arttıkça diş hareket miktarının da arttığını belirtmişlerdir (19, 134). Buna zıt olarak hafif kuvvetlerin daha fazla diş hareketine neden olduğunu belirten yayınlar da mevcuttur (114). Bazı yazarlar ise diş hareket miktarının, ortodontik kuvvet büyüklüğünden etkilenmediğini belirtmişlerdir (128, 135). Sıçanlarda yapılan hayvan çalışmalarının %37'sinde 20-50 gr, %12'sinde 50-100 gr, %20'sinde 20 gr'dan küçük, %1'inde ise 100 gr'dan büyük kuvvetler kullanılmıştır (114). Bu literatür verisine uygun olarak çalışmamızda en çok kullanılan kuvvet miktarı olarak 50 gr (132) kuvvet uygulanmıştır.

5.6. Deney Süresinin Belirlenmesi

Literatürde sıçanlarda 5 dakika (136) ile 3 ay (137) arasında değişen sürelerde ortodontik diş hareketi yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmaların %40'ı 1 haftadan az, %31'i 1-2 hafta, %18'i 2-4 hafta, %1'i ise 4 haftadan uzun sürmüştür (114). Hem klinik hem de hayvan çalışmaları diş hareketinin birkaç fazı olduğunu göstermiştir. Gerçek diş hareketinin gerçekleştiği lineer faza ulaşmak birkaç gün ile birkaç hafta arasında sürmektedir. Bu nedenle diş hareketinin lineer fazındaki biyolojik cevabı tarif etmeyi amaçlayan çalışmalarda deney süresi en az 2 hafta olmalıdır (114). Bu literatür bilgisine dayanarak, çalışmamızda da deney süresi 2 hafta olarak belirlenmiştir. Trombositlerin yarı ömürleri ve muhteva ettikleri büyüme faktörlerinin etki süresinin kısa olması nedeniyle deney süresi 2 haftadan uzun planlanmamıştır. Choi et al. (138) in vivo koşullarda büyüme faktörlerinin direkt olarak etkili oldukları periyodu 5 günden az olarak belirtmiştir. Tsay et al. (139) ise in vitro çalışmasında TZP jel uygulandıktan 24 saat sonra PDGF-AB'nin %80 ve TGF- β 1'in %82 oranında salındığını ve sonraki 14 günde de salınımın devam ettiğini göstermiştir. Brady et al. (140) ise ekzojen olarak uyguladıkları TGF- β 1'in, IL-6 ekspresyonunu baskıladığını ve bu inhibisyonun 6 gün boyunca devam ettiğini belirtmiştir.

Alt gruplar (1, 3, 7, 14. günler) ise literatürdeki benzer çalışmalar ışığında oluşturulmuştur (82, 96, 113, 141).

5.7. Deney Dizaynı

Deneyimizde split-mouth dizayn tercih edilmiştir. Böylece fizyolojik molar distal drifti, keserlerin devam eden erüpsiyonu, ankraj olarak kullanılan keserlerin olası distal tipingi, fizyolojik burun büyümesi ve buna eşlik eden keserlerin öne hareketi ile oluşan 1. molar-keser arası mesafedeki (M_1-I) değişim ortodontik diş hareketi uygulanmayan kontrol tarafının da ölçülmesi ile elimine edilmiştir. Sol tarafa ortodontik kuvvet uygulanmamış ancak sağ ve sol keser dişler blok haline getirilmiştir. Bu sayede sol taraf M_1-I mesafesi ortodontik kuvvet uygulanmadan önce ve sonra ölçülerek, sol keser dişin eğilme miktarı elde edilmiştir. Sağ taraf 1. molar dişin saf mezializasyon miktarı ise deney tarafında ölçülen hareket miktarından, kontrol tarafında ölçülen hareket miktarı çıkarılarak elde edilmiştir.

5.8. Diş Hareket Miktarının Ölçülmesi

Diş hareket miktarının ölçümü, literatürdeki bazı çalışmalarda 1. ve 2. Molar arası mesafe ölçülerek (82) veya 1. molar mezial yüzeyi ile 3. molar distal yüzeyi arası mesafe ölçülerek (142) gerçekleştirilmiştir. Ancak çalışma alanı kısıtlı olan sıçan ağzında, ölçüm için daha distaldeki bölgelerin kullanılmasındansa, 1. molar mezial yüzeyi ile keser arası mesafe (84) tercih edilmiştir.

5.9. TZP ve TFP Elde Etme Metodunun Belirlenmesi

TZP elde edilmesinde kullanılan çok sayıda protokol bulunmaktadır (Tablo 2.2). Landesberg et al. yaptıkları çalışmada, 200g devirde 10 dk santrifüj ile elde edilen trombosit konsantrasyonunun optimum olduğunu, 250g üstündeki devirlerde trombosit peleti oluştuğunu bildirmiştir (143). Buna karşın Marx et al. ise 1000g devirde 4 dakikalık ilk santrifüj sonrası, 800g devirde 8-9 dakikalık ikinci santrifüj işleminin TZP elde edilmesindeki en efektif protokol olduğunu savunmaktadır (45). Bu çalışmada uygulanan protokolle (66), (220g, 20 dk + 480g, 20 dk) kan örneklerinde herhangi bir trombosit peleti gözlenmemiştir. Uyguladığımız protokol trombosit hücre mebranlarının parçalandığı 30.000g.dk sınırının altındadır ($220 \times 20 + 480 \times 20 = 14.000g.dk$).

TFP için ise özel tanımlanmış bir protokol bulunmamaktadır. Tüm TZP protokolleri ile aynı zamanda TFP de elde edilebilmektedir.

5.10. Trombosit Sayısı İle Büyüme Faktörü Seviyesi Arasındaki İlişki

Okuda et al. (144), yaptıkları in vitro çalışmada 20 sağlıklı bireyden alınan kandan santrifüj yoluyla elde edilen TZP örneklerinde, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile PDGF-AB ve TGF- β 1 seviyelerini araştırmışlar ve TZP içerisinde, konsantre edilmemiş plazmadaki değerlerinin 440.6%'sı oranında PDGF-AB ve 346.6%'sı oranında TGF- β 1 tespit etmişlerdir. Sonuçta Okuda et al. PDGF-AB ve TGF- β 1 seviyeleri ile trombosit sayısı arasında anlamlı kolerasyon olduğunu belirtmiştir.

2003 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, trombosit konsantrasyonundaki 8 kat artış, PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF ve endotelial büyüme faktörü konsantrasyonlarında lineer bir artışa neden olurken, IGF-1 konsantrasyonunda anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Bununla birlikte yazar, büyüme faktörü konsantrasyonlarının kişiden kişiye değişebileceğini vurgulamıştır (145).

TZP ile ilgili literatürdeki çalışmaların hemen hemen tamamına yakını bu bilgiye dayanarak yapılmış çalışmalardan oluşmaktadır. Bu çalışmada da Okuda et al. (144)'nın bulguları doğrultusunda tam kan, TZP ve TFP örneklerinde trombosit sayımı yapılmıştır. Trombosit sayımı sonucunda elde edilen TZP'da, tam kandaki değer 4,5 katı trombosit olduğu tespit edilmiştir.

Bunun yanında, Weibrich et al. (146), yaptıkları çalışmada gönüllü 115 bireyden aldıkları venöz kanlardan iki farklı metod kullanarak TZP hazırlamışlardır. Sonuçta bu iki metodla hazırlanan TZP içerisindeki trombosit sayıları ile ortama salınan büyüme faktörleri arasında herhangi bir kolerasyon olmadığını tespit etmiştir. Sonuç olarak alınan tam kandaki hiçbir parametrenin büyüme faktörü miktarını belirlemede kullanılamayacağı ve kullanılan yöntemle göre farklılıklar gözlenebileceği öne sürülmüştür.

5.11. Uygulanacak TZP konsantrasyonunun belirlenmesi

Literatürde TZP'nın insanda biyolojik olarak etkili konsantrasyonunun 1 milyon trombosit/ μ l olduğu savunulmaktadır (45, 147, 148). Sağlıklı bir bireyin tam kanındaki trombosit aralığı 150.000- 350.000 trombosit/ μ l olduğundan, optimum TZP konsantrasyonunun başlangıç tam kan değerinin 3-5 katı olacak şekilde tanımlanmıştır (147).

Sıçanlarda ise mm^3 başına düşen trombosit sayısının normal değeri $500-1300 \times 10^3$ 'dür (149). Bu çalışmada da TZP elde edilmesinde kullanılan tam kandaki trombosit sayısı $793 \times 10^3 / \text{mm}^3$

olarak tespit edilmiştir. Uygulanan TZP'daki trombosit konsantrasyonu ise $3617 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 'tür. Yani TZP'deki mm^3 başına düşen trombosit sayısı, başlangıç tam kan değerinin 4,5 katıdır. Bu değer mevcut literatür bilgisine göre optimum TZP konsantrasyonu sınırları içinde ve üst sınıra yakındır.

Ayrıca Haynesworth et al. (150) insan mezenşimal kök hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyonunun direkt olarak trombosit konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Haynesworth et al. yaptıkları çalışma sonucu, tam kandaki trombosit konsantrasyonunun en az 4 ila 5 katını içeren TZP'nın yeterli hücre sel cevaba neden olduğunu belirtmiştir.

Ancak literatürde fibroblastların, 2,5 kat trombosit içeren TZP konsantrasyonlarında proliferasyonlarını arttıracak şekilde optimum uyarıldıklarından söz eden in vitro çalışmalar da bulunmaktadır (151, 152).

Bununla birlikte çok sayıda in vitro çalışma; trombositler, çeşitli bağ doku hücreleri ve vasküler hücrelerde bulunan büyüme faktörleri tarafından oluşturulan kemotaktik, mitojenik ve sentez ile ilgili uyarının doz bağımlı olduğunu belirtmektedir (153, 154). Bu çalışmalar aynı zamanda çoğu büyüme faktörünün doz bağımlı eğrilerinin bire bir orantılı olmadığını, hücre yüzey reseptörlerinin tamamı, ilgili büyüme faktörü tarafından işgal edildiğinde büyüme faktörlerinin asemptotik seviyeye ulaştığını ortaya koymuştur. Bu nedenle artan büyüme faktör konsantrasyonlarının ilave etkisinin olmadığı belirtilmektedir (154). Hatta bazı büyüme faktörlerinin bir kez yüksek konsantrasyona ulaştıktan sonra hücre fonksiyonu üzerinde inhibitör etki gösterebileceğinden söz eden çalışmalar bulunmaktadır (154, 155). Doz bağımlı etki hem büyüme faktörü hem de hücre tipine bağlı olduğundan, in vivo olarak trombositlerin ve dolayısıyla büyüme faktörlerinin en etkili konsantrasyonları hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır (35).

Bu çalışmada ise başlangıç tam kan değerinin 4,5 katı trombosit içeren TZP'nın osteoblast hücreleri üzerinde proliferasyonu azaltacak şekilde inhibitör etki, osteoklast hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif derecede inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur.

5.12. TZP'nın Aktivasyonu İçin Uygun Yöntemin Belirlenmesi

Bu çalışmada TZP'nın aktivasyonu için kalsiyum klorid-trombin aktivasyonu veya donma-çözülme döngüsü yerine in vivo kollojen aktivasyonu metodu kullanılmıştır. Kalsiyum klorid-trombin aktivasyonu ile TZP jel hale geldiğinden bu yöntem enjeksiyon için uygun bir

yöntem değildir. Donma-çözülme döngüsü ise uzun zaman aldığından klinik yerine in vitro çalışmalarda tercih edilen bir yöntemdir. İn vivo kollojen aktivasyonu, trombin aktivasyonu ile kıyaslandığında, büyüme faktörlerinin daha yavaş ve sürekli salgılanmasına neden olduğu için klinik uygulamalarda tercih edilen bir metottur. Kuvvetli trombosit aktivatörü olan tip 1 kollojen, dişeti, dentin, sement, kemik ve periyodontal ligament gibi birçok dokunun temel yapısal bileşenidir. Kollojen aktivasyonu ile TGF- β 1'in 7 günlük periyotta kümülatif olarak %80 daha fazla ve daha sürekli salgılandığı bildirilmiştir (78). İn vivo kollojen aktivasyonunun diğer bir avantajı bu yöntemle henüz pıhtı oluşmamış olduğu için TZP'nin, çok daha küçük çapta iğne uçları ile enjekte edilebilmesidir. Ayrıca bu yöntemde aktivasyon için trombin veya kalsiyum gibi ekzojen bir madde kullanılmadığı için immünolojik reaksiyon riski elimine edilmiştir.

5.13. TZP'nin enjeksiyonu

2008 yılında Sampson et al (36), TZP elde edilmesinde, trombositlerde oluşabilecek travma ve irritasyonu önlemek için venöz kanın alınması sırasında 18-19 gauge (G) çapındaki kelebek iğnelerin kullanılmasını önermiştir. Ancak 2014 yılında yapılan güncel bir başka çalışmada ise enjektör çapının trombosit fonksiyonuna etkisi olmadığı gösterilmiştir (156). Enjeksiyon sırasında daha az acıya neden olacağından 30 G'luk enjektörlerin kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada da TZP ve TFP enjeksiyonları 30 G iğne çapına sahip enjektörler ile literatürdeki ekzojen büyüme faktörü enjeksiyonu yapılan çalışmalara (6-8) uygun olarak 1. molar diş bukkalinden submukozal olarak uygulanmıştır.

5.14. PDL Genişliği Bulgularının Yorumlanması

Brudvick ve Rygh (157), sıkışan taraf periyodontal ligament genişliğinin ortodontik kuvvet uygulandıktan sonraki 7. günde normal boyutlarına dönmeye başladığını belirtmektedir. Ayrıca Tengku et al. (82) da sıçan üst 1. molar dişe mezial yönde ortodontik kuvvet uyguladıkları çalışmalarında, sıkışan taraf PDL aralığının 1-7. günlerde azaldığını, 14. günde ise bu mesafede artış gözlendiğini bulmuştur. Bu literatür bilgisiyle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da kontrol grubunda sıkışan taraf periyodontal ligament genişliğinin, 7. günden sonra artış göstererek, normale döndüğü gözlenmiştir. Buna karşın hem TZP hem de TFP grubunda 1. günden itibaren sıkışan taraf PDL genişliğinde anlamlı artış tespit edilmiştir. Bu artış 7. güne kadar devam etmiştir. 7-14. günler arasında ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Buna göre periyodontal reorganizasyon, herhangi bir enjeksiyon yapılmayan kontrol grubunda büyük oranda 7- 14. günler arası gerçekleşirken, TZP ve TFP gruplarında 1-

7. günler arası gerçekleşmiştir. Yani hem TZP, hem de TFP gruplarında periyodonsiyumdaki reorganizasyon, kontrol grubuna kıyasla daha erken gerçekleşmiştir. Bu nedenle; kontrol ile TZP, TFP grupları arasındaki bu farklılık TFP ve TZP enjeksiyonları ile ortama salınan büyüme faktörlerine atfedilebilir. Dolayısıyla TZP ve TFP'nın içerdikleri büyüme faktörlerinin, PDL dokusundaki hücresel aktiviteyi arttırdığı ve buradaki dokuların kontrol grubundakinden daha hızlı bir şekilde fizyolojik olarak normal hale geldiği düşünülmektedir.

Bu hipotezi destekler şekilde Caceres et al. (158), yaptıkları in vitro çalışmada hem TZP hem de TFP'nın, ekstra selüler matriks yapısal moleküllerinin üretimi ve myofibroblastların diferansiyasyonu yoluyla, hasara uğramış gingival dokuların yeniden yapılanmasını stimüle ettiğini bulmuştur.

Sıçan PDL fibroblast hücreleri üzerinde in vitro olarak yapılan başka bir çalışmada da (159), çeşitli büyüme faktörlerinin bu hücreler üzerindeki etkisi araştırılmış ve özellikle rhPDGF-BB and IGF-I büyüme faktörlerinin PDL fibroblast hücreleri üzerinde yüksek proliferatif, kemotaktik ve mitojenik etkisi olduğu vurgulanmıştır.

Okuda et al. (144) ise yaptığı in vitro çalışmada TZP'nın periodontal ligament hücrelerindeki ve gingival fibroblastlardaki DNA sentezini stimüle ettiğini bulmuştur.

Ayrıca literatürde büyüme faktörlerinden TGF- β , kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak gösterilmektedir. Bu büyüme faktörünün, kollajenazı aktive eden diğer faktörlerin uyarıcı etkisini azalttığı belirtilmiştir (43).

5.15. Osteoblast Sayısı Bulgusunun Yorumlanması

Weibrich et al. yaptığı in vitro çalışmada (160), osteoblast benzeri hücrelerin doz bağımlı olarak, belli bir seviyeye kadar trombosit ilavesi ile proliferasyon oranının arttırılabileceğini belirtmiştir. Belli seviyeden sonra ise plato seviyesine ulaşıldığı, bu seviyeden sonra yapılan trombosit ilavesinin proliferasyonu daha fazla arttırmadığı vurgulanmıştır.

Graziani et al. (151), değişik konsantrasyonlardaki TZP'nın oral fibroblast ve osteoblast içeren insan kültüründe yaptığı in vitro çalışmada, diğer TZP konsantrasyonları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da, maksimum proliferatif etkinin 2,5 kat trombosit içeren TZP konsantrasyonu ile sağlandığını bulmuştur. 2,5 katın üzerindeki trombosit konsantrasyonlarının, proliferasyonda azalma ve osteoblast fonksiyonu üzerinde suboptimal etki oluşturacağını belirtmektedir.

Okuda et al. (144), yaptıkları in vitro çalışmada TZP örneklerinin osteoblastik, epitelyal, fibroblastik ve periyodontal ligament hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Hücresel mitojenik aktivite değerlendirilmesi, hücre sayımı yoluyla yapılmıştır. ALP ekspresyonu ise immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. 2003 yılında yapılan bu çalışmada TZP'nin, osteoblastlardaki DNA sentezi ve hücre bölünmesini stimüle ettiği, ancak ALP ekspresyonunu ve epitelyal hücre bölünmesini baskıladığı bulunmuştur. Sonuç olarak TZP'nin, hücre proliferasyonunu, hücre tipine özel olarak regüle ettiği ve bu hücre tipine spesifik davranışın periyodontal rejeneratif tedavide başarılı şekilde kullanılabileceği vurgulanmıştır.

2004 yılında Arpornmaeklong et al. tarafından yapılan in vitro bir çalışmada (161), değişik konsantrasyonlarda TZP, TFP ve BMP-2'nin sıçanlardan elde edilen kemik hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. 21 günlük kültür periyodu boyunca 3 gün aralıkla bu kültürlerdeki alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi, 18 ve 21. günlerde de kalsiyum içeriği ölçülmüştür. Çalışma sonucunda TZP'nin ALP aktivitesinde ve kültürdeki kalsiyum depozisyonunda azalmaya neden olduğu, BMP-2'nin ise tam tersi hücre cevabına sebep olarak hem ALP aktivitesini hem de mineral depozisyonunu indüklediği bulunmuştur. Yazar sonuç olarak osteojenik indüksiyonda TZP'nin, BMP-2'nin yerine kullanılamayacağını belirtmektedir.

2008 yılında Slapnicka et al. tarafından yapılan başka bir in vitro çalışmada (162) ise aktive olmuş ve aktive olmamış değişik konsantrasyonlardaki (0.38, 0.95, 1.95 ve 2.86 kat trombosit içeren) TZP örneklerinin insan osteoblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi; 24, 48 ve 72. saatlerdeki osteoblast hücre sayımı yapılarak değerlendirilmiştir. Sonuçta hem aktive olmuş hem de aktive olmamış tüm TZP örneklerinde, TZP içermeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında daha az sayıda osteoblast hücresi tespit edilmiştir.

Yukarıda verilen literatür bilgisi ışığında TZP'nin, osteoblast hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerine etkisi ile alakalı olarak net bir bilginin olmadığı söylenebilir. Ancak, tam tersini iddia eden yayınlar (161, 162) bulunmakla birlikte genel görüş; TZP'nin osteoblastların proliferatif etkisini arttırdığı, ancak daha yüksek konsantrasyonların ilave olumlu etki yaratmadığı yönündedir. Yüksek konsantrasyonların ise inhibitör etkisinden bahsedilmektedir. Graziani et al. (151), 2,5 katın üzerindeki trombosit konsantrasyonlarının proliferasyonda azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Weibrich et al. (148), 1 milyon trombosit/ μ l'den düşük konsantrasyonlardaki TZP'nin kemik rejenerasyonu üzerine suboptimal etki, yüksek konsantrasyonların ise inhibitör etki gösterebileceğini belirtmiştir. Raporlardaki farklılıkların, çalışmalarda uygulanan farklı protokoller, farklı TZP konsantrasyonları, farklı türler veya bu

türlerin büyüme faktörlerine olan duyarlılıklarındaki bireysel varyasyonlar nedeniyle olması mümkündür.

Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular ise başlangıç tam kan değerinin 4,5 katı trombosit içeren TZP'nin osteoblast hücreleri üzerinde belirgin proliferatif etki göstermediği yönündedir. Hatta TZP grubunda 14. günde, osteoblast sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Diğer günlerde de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da TZP grubu osteoblast sayıları, kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle bulgular, TZP'nin osteoblast hücreleri üzerinde proliferasyonu inhibe edici etkisinin baskın geldiği şeklinde de yorumlanabilir. Bu durum, Slapnicka et al. (162)'un bulgularıyla benzerlik gösterse de; Graziani et al. (151) ve Weibrich et al. (148)'un bahsettiği inhibitör etkiden de kaynaklanmış olabilir.

Literatürde TFP ile ilgili sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. 2009 yılında yapılan bir çalışmada (163), TFP'nin sıçan kafatası kemiğinden izole edilen osteoblast hücreleri üzerindeki etkisi in vitro olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada 24, 48 ve 72. saatlerdeki osteoblast proliferasyonu değerlendirilmiştir. Sonuçta TFP'nin osteoblast proliferasyonunu stimüle ederken, osteoblastik diferansiyasyonu inhibe ettiği belirtilmiştir. Ancak bizim çalışmamızdaki bulgular TFP'nin, osteoblastlar üzerinde proliferasyonu arttırıcı etkisi olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte TFP, TZP için bahsedilen inhibitör etkiyi de göstermemiştir. Bunun nedeni, çok daha düşük trombosit konsantrasyonuna sahip TFP'nin, osteoblastları pozitif veya negatif yönde etkileyecek yeterli trombosit konsantrasyonuna sahip olmaması olabilir.

5.16. Osteoklast Sayısı Bulgusunun Yorumlanması

Bir bireyin kemik rezorbsiyon potansiyeli ve bunun sonucu oluşan ortodontik diş hareketi, olgun osteoklast ve prekürsör hücrelerin açığa çıkmasına, osteoklast farklılaşmasına ve kemik-PDL yüzeyindeki aktif osteoklast sayısına bağlıdır. Bu çalışmada da TZP'nin ve TFP'nin diş hareketi üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, benzer çalışmalarda olduğu gibi (123, 164, 165) ortodontik diş hareket miktarının milimetrik ölçümüne ilave olarak, sıkışma bölgesindeki alveoler kemik duvarı boyunca oluşan aktif osteoklastların sayısına da bakılmıştır.

Osteoklastlar, kemik remodeling olayında çok önemli bir yere sahip olmasına karşın, literatürde TZP'nin osteoklastlar üzerindeki etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Ogino et al. (166), 2009 yılında yaptığı in vitro çalışmada TZP ve TFP'nın osteoklastogenez üzerindeki etkisini in vitro olarak araştırmıştır. Bunun için sıçan kemik iliği hücrelerini kullanmış ve 4 gün boyunca TFP ve farklı konsantrasyonlarda TZP içeren kültürlerde inkübe etmiştir. 4 gün sonunda hücreler TRAP primer antikoru ile boyanmış ve TRAP pozitif osteoklast benzeri çok çekirdekli hücreler sayılmıştır. Sonuçta TFP'nın, osteoklast benzeri hücre formasyonuna etkisinin olmadığı; TZP'nin ise doz bağımlı olarak osteoklastogenez ve dolayısıyla kemik rezorbsiyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir.

Benzer şekilde insan periferik kanındaki osteoklast öncü hücreleri üzerine TZP'nin etkisinin araştırıldığı bir başka in vitro çalışmada, %10'luk TZP'nin, kemik kollojen yıkımını azalttığı bulunmuş, dolayısıyla bu konsantrasyonun, osteoklast aktivasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonların ise, diferansiyasyonun erken safhalarında osteoklast formasyonunu engellediği bildirilmiştir (167).

Ayrıca literatürde TGF- β 1 ekspresyonunun osteoklastların yaşam süresini olumsuz yönde etkilediği ve bu hücrelerin apoptozisine neden olduğunu belirten yayınlar mevcuttur (168, 169).

1998 yılında Brady et al. yaptığı bir in vitro çalışmada, TGF- β 1'in, insan osteoblast benzeri PDL hücrelerinin fenotipi ve fonksiyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışmada TGF- β 1'in 0.4 ve 10 ng/ml konsantrasyonları arasında, PDL hücreleri üzerinde mitojenik olduğu ve doz bağımlı olarak, PDL hücrelerinin osteoblast benzeri özelliklerini (alkelen fosfataz aktivitesi, osteokalsin ekspresyonu, kalsiyum fosfat nodül formasyonu gibi) baskıladığı belirtilmiştir. Özetle, bu çalışmanın bulguları mekanik stresle indüklenen TGF- β 1 ekspresyonunun, PDL hücrelerinin mitogenezini uyaran, ancak bu hücrelerin osteoblast benzeri özelliklerini baskılayan, bununla birlikte IL-6'nın neden olduğu kemik rezorbsiyonunu azaltan fizyolojik bir mekanizma olduğunu savunur (140).

Bu çalışmada sıkışan taraf PDL bölgesindeki aktif osteoklast sayısı bakımından grup içi ve gruplar arası karşılaştırmada fark çıkmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmanın bulguları TZP ve TFP'nın osteoklastlar üzerinde negatif veya pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etkisi olmadığı yönündedir. Bununla birlikte, TFP grubunda 3. ve 7. günlerde, kontrol grubunda ise 3. gün osteoklast sayısında gözlenen belirgin yükseliş, TZP grubunda zamanların hiçbirinde gözlenmemiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen bulgular; TZP grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha az molar mezializasyonu tespit edildiğinden, Ogino et al. (166)'un bulgularıyla benzerlik gösterir. TZP'nin diş hareketi için gerekli olan

osteoklastların oluşumunu engellediği ve bu nedenle TZP enjeksiyonu yapılan bölgede molar mezializasyonunun oluşmadığı düşünülmektedir. Ayrıca osteoklast sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmasa da, osteoblast hücreleri üzerindeki inhibisyon nedeniyle, osteoklast hücrelerinin osteoblast hücrelerinden farklılaşması safhasında da bir inhibisyon meydana gelmiş olması mantıklıdır.

TFP grubunda ise bulgular, yine Ogino et al. (166)'un bulgularıyla paralel olarak, TFP'nin osteoklastogenezis üzerindeki herhangi bir inhibitör etkiye neden olduğunu desteklememektedir. Bu bulguyu destekler şekilde molar mezializasyonu bakımından kontrol grubuyla TFP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte molar mezializasyon miktarı kontrol grubundan daha azdır.

5.17. Diş Hareketi Bulgularının Yorumlanması

Literatürde büyüme faktörlerinin periyodontal rejenerasyonda ve ortodontik diş hareketi sırasındaki remodeling olayında etkili olduğu belirtilmektedir. Ancak bu büyüme faktörlerinin büyük kısmı daha çok yapım yönünde, dokuların iyileşmesi ve yenilenmesi yönündeki hücresel olaylarda görev almaktadır. Osteoklastik aktivitede rol aldığı belirtilen büyüme faktörleri ise PDEGF, FGF ve VEGF'dir. Bunlardan VEGF'in damar permeabilitesini arttırarak enflamasyonda görev alan birçok hücre ile birlikte osteoklastların da bölgeye gelişini kolaylaştırdığı belirtilmektedir. PDEGF ve FGF ise ortodontik diş hareketi sırasında hem basınç, hem gerilim tarafında tespit edilmişlerdir. Bu nedenle hem yapım, hem yıkım prosesinde rol aldıkları düşünülmüştür.

Ortodontik diş hareketi istenen dişin bukkalinden submukozal olarak büyüme faktörü uygulayan ve bu büyüme faktörlerinin ortodontik diş hareketi oranında artışa neden olduğunu belirten yayınların aksine (6-8), bu çalışmada ekzojen olarak uygulanan TZP'nin ortodontik diş hareketini yavaşlatıcı etkisinin olduğu bulunmuştur. Ancak bizim çalışmamızda farklı olarak tek bir büyüme faktörü yerine, çeşitli ve çok sayıda büyüme faktörü ihtiva eden trombositler konsantre halde uygulanmıştır.

Ortodontik diş hareketinin engellenmesi; ya anabolik faaliyette artış, ya katabolik faaliyetin engellenmesi, ya da her iki olayın da etki göstermiş olması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Bu çalışmada osteoblast ve osteoklast sayıları için elde edilen bulgular çok belirgin olmadığından, TZP'nin ortodontik diş hareketi üzerindeki bu etkisinin, bunlardan hangisi ve ya hangileri nedeniyle olduğu bu çalışmada net olarak ortaya konulamamıştır. Osteoblast ve osteoklast bulgularında belirgin farkların çıkmaması, bu deneyin in vivo koşullarda yapılmış

olması nedeniyle olabilir. İzole kültür ortamlarında, TZP ve TFP'nin osteoblast ve osteoklast hücreleri üzerine etkisini inceleyen in vitro çalışmaların aksine, bu çalışmada incelenen bölgeye dolaşımdan ve komşu dokulardan hücre göçü gerçekleşmiş olması ve bu nedenle deney gruplarında kontrol grubundakine benzer sonuçlar çıkmış olması muhtemeldir.

Bununla birlikte, bu etkinin TZP enjeksiyonu ile, osteoblastların diferansiyasyon aşamasında inhibe olması ve 1. molar diş bölgesinde ortodontik diş hareketi için gerekli olan osteoklast oluşumunun ve kemik rezorbsiyonunun engellenmesi nedeniyle ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Ayrıca TZP içindeki büyüme faktörlerinin, özellikle ortodontik kuvvet etkisiyle distorsiyona uğrayan PDL kollojen lifleri üzerinde rejeneratif etkiye neden olmuş olması da bu etkiye neden olmuş olabilir. Literatürde de benzer şekilde; daha fazla miktarda kemik yapımı ve periyodontal reorganizasyona neden olan statik manyetik alanın diş hareketini azatabileceği belirtilmektedir (170, 171).

TFP'nın ise, diş hareketi miktarı ile yakın kolerasyon gösteren aktif osteoklast sayısı üzerinde etkisi bulunmamıştır. Bu nedenle ortodontik diş hareketi üzerine TFP'nın belirgin inhibe edici etkisi ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmasa da, M1'in saf mezializasyon miktarı, TFP grubunda kontrol grubuna kıyasla daha az olarak bulunmuştur. Bunun nedeni TFP'nin az miktarlarda da olsa büyüme faktörü kaynağı olan trombosit muhteva etmesi ve periyodontal rejenerasyon bakımından TZP ile benzer etki göstermiş olması olabilir.

5.18. Sonuçlar

1. TFP ve TZP periyodontal reorganizasyon bakımından benzer etki göstermiştir.
2. Bu çalışmada kullanılan TZP konsantrasyonu osteoblast hücrelerinin mitojenik aktivitesi üzerinde hafif inhibitör etki göstermiştir. Osteoklast sayısı üzerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir etki bulunamamıştır.
3. TFP'nin aktif osteoklast ve osteoblast sayısı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunamamıştır.
4. Literatürde TZP içerisindeki bazı büyüme faktörlerinin tek başlarına osteoklastlar üzerinde proliferatif etkisi olduğu, dolayısıyla ortodontik diş hareketini hızlandırdığı gösterilse de; TZP, bir bütün halinde uygulandığında diş hareketini yavaşlatır/engeller. Bu nedenle uygulandığı bölgenin ankrajını arttırmak için kullanılabilir.

TZP'nin diş hareketi üzerindeki bu etkisi, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diferansiyasyonun erken safhalarında osteoblastları etkileyerek, osteoklastogenezisi engellemesi nedeniyle olabilir.

5. TFP'nin diş hareket miktarı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunamamıştır. Ancak TFP grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha az miktarda molar mezializasyonu olmuştur. Bu etki TFP'nin TZP'ye göre çok daha küçük miktarlarda büyüme faktörü içermesi nedeniyle olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Bister D, Meikle MC. Re-examination of ‘Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung’(Some contributions to the theory of the regulation of teeth) published in 1904–1905 by Carl Sandstedt. The European Journal of Orthodontics 2013; 35: 160-168
2. Lavine L, Lustrin I, Rinaldi R, Shamos M. Clinical and ultrastructural investigations of electrical enhancement of bone healing. Annals of the New York Academy of Sciences 1974; 238: 552-563
3. Stark TM, Sinclair PM. Effect of pulsed electromagnetic fields on orthodontic tooth movement. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 1987; 91: 91-104
4. Goldie RS, King GJ. Root resorption and tooth movement in orthodontically treated, calcium-deficient, and lactating rats. American journal of orthodontics 1984; 85: 424-430
5. Sandy JR, Farndale RW, Meikle MC. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 1993; 103: 212-222
6. Kaku M, Kohno S, Kawata T, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on osteoclast induction during tooth movement in mice. J Dent Res 2001; 80: 1880-1883
7. Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. J Dent Res 2003; 82: 177-182

8. Seifi M, Badiie MR, Abdolazimi Z, Amdjadi P. Effect of basic fibroblast growth factor on orthodontic tooth movement in rats. *Cell J* 2013; 15: 230-237
9. Ildeu Andrade Jr SRAT, and Paulo E. A. Souza. Inflammation and Tooth Movement: The Role of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors. *Semin Orthod* 2012; 18: 257-269
10. Proffit WR, Fields HW. Contemporary orthodontics. (3rd ed), editor^editors. St Louis: Mosby., 2000.
11. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *American journal of orthodontics* 1967; 53: 721-745
12. Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 411-450
13. Schwarz AM. Tissue Changes Incident to Orthodontic Tooth Movement. *Int. J. Orthod.* 1932; 18: 331-352
14. A. O. Human tissue response to orthodontic intervention of short and long duration. *Am J Orthod Oral Surg.* 1942; 28: 263–301
15. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod* 1967; 53: 721-745
16. Yanez EER, White L, Araujo RC, Gomez Galuffo A. 1,001 Tips for Orthodontics and its Secrets. (2013).
17. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *Angle Orthod* 2003; 73: 86-92
18. Ülgen M. Ortodontik Tedavi Prensipleri. (7 ed), editor^editors. Ankara, 2005.
19. Storey E. The nature of tooth movement. *Am J Orthod* 1973; 63: 292-314
20. Bridges T, King G, Mohammed A. The effect of age on tooth movement and mineral density in the alveolar tissues of the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988; 93: 245-250
21. Thomas MG, Brainerd FS. Orthodontics Current Principles and Techniques. (Toronto, The C.V. Mosby Company, 1985.
22. Lin NH, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodontal Res* 2008; 43: 514-523

23. Mostafa YA, Weeks-Dybvig M, Osdoby P. Orchestration of tooth movement. *Am J Orthod* 1983; 83: 245-250
24. Howard PS, Kucich U, Taliwal R, Korostoff JM. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 1998; 33: 500-508
25. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, et al. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontal Res* 1990; 25: 179-185
26. Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, et al. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 108: 402-409
27. Lerner UH. Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Seminars in orthodontics* 2012; 18: 237-248
28. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17: 77S-83S
29. Canalis E. Update in new anabolic therapies for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1496-1504
30. Smith RK, Roberts WE. Cell kinetics of the initial response to orthodontically induced osteogenesis in rat molar periodontal ligament. *Calcif Tissue Int* 1980; 30: 51-56
31. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129: 458-468
32. Guyton AC HJ. *Tıbbi Fizyoloji*. (Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2001).
33. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Osteoprotegerin, Rank ve Rank Ligandı. *Türk Biyokimya Dergisi* 2007; 32 (4): 178-184
34. Babür C, Özcan G. OPG/RANK/RANKL'İN PERİODONTOLOJİDEKİ YERİ. *GÜ Diş Hek Fak Dergisi* 2010; 27(2): 137-144
35. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What Is Platelet-Rich Plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine* 2011; 19: 142-148

36. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2008; 1: 165-174
37. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-189
38. Boyapati L, Wang HL. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent* 2006; 15: 160-170
39. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-412
40. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood* 2000; 96: 3334-3342
41. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12: 261-273
42. Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003; 69: 664
43. Ciğer S. Yara İyileşmesi ve Büyüme Faktörleri, In: Tüm yönleriyle yara iyileşmesi (Ankara, 1996: p. 20.
44. Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg* 1998; 25: 397-405
45. Marx R, Garg A. Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich Plasma. (2005.
46. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 93-103
47. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646
48. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996; 67: 407-417
49. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, et al. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg* 1999; 134: 200-205

50. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am* 2004; 29: 551-563
51. Hom DB, Maisel RH. Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101: 349-354
52. Alkan A, Esen E. Diş hekimliğinde trombositten zengin plazma. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Dergisi* 2006; 23(2): 137-142
53. Anila S, K N. Applications of Platelet Rich Plasma for Regenerative Therapy in Periodontics. *Trends Biomater. Artif. Organs* 2006; 20(1): 78-83
54. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs* 1987; 10: 47-50
55. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294-1299
56. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22: 45-53
57. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 555-558
58. Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 1018-1025
59. Hancı M. Temporomandibuler eklem bozukluklarının tedavisinde intraartiküler trombositten zengin plazma uygulaması ve artrosentez uygulamaları ile etkinliğin karşılaştırılması Tıpta Uzmanlık, Necmettin Erbakan Üniversitesi Konya 2012:
60. Trink A, Sorbellini E, Bezzola P, et al. A randomized, double-blind, placebo- and active-controlled, half-head study to evaluate the effects of platelet-rich plasma on alopecia areata. *Br J Dermatol* 2013; 169: 690-694

61. Redaelli A, Romano D, Marciano A. Face and neck revitalization with platelet-rich plasma (PRP): clinical outcome in a series of 23 consecutively treated patients. *J Drugs Dermatol* 2010; 9: 466-472
62. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg* 2011; 20: 518-528
63. Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, Gosens T. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. *Am J Sports Med* 2010; 38: 255-262
64. Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J Am Acad Orthop Surg* 2009; 17: 602-608
65. Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *Eur Spine J* 2008; 17 Suppl 4: 441-451
66. Sarıgüney Y. Periferik sinir yaralanmalarının onarımında trombosit zengin plazmanın sinir rejenerasyonu üzerine etkisi, Tıpta Uzmanlık, Gazi üniversitesi, Ankara 2006:
67. Brissett AE, Hom DB. The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 11: 245-250
68. Alio JL, Arnalich-Montiel F, Rodriguez AE. The role of "eye platelet rich plasma" (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 1257-1265
69. Yi-No Wu K-CC, Chien-Chih Wu, Han-Sun Chiang. AB84. Characteristic of platelet-rich plasma and its effects on on improving neurogenic erectile dysfunction. *Translational Andrology and Urology* 2014; 3:
70. Giordano GF, Rivers SL, Chung GK, et al. Autologous platelet-rich plasma in cardiac surgery: effect on intraoperative and postoperative transfusion requirements. *Ann Thorac Surg* 1988; 46: 416-419

71. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007; 25: 230-240
72. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107: 229-237; discussion 238-229
73. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, 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
74. Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 521-528
75. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an in vitro study. *Transfusion* 2009; 49: 91-98
76. Johnson LN, Winter KM, Reid S, Hartkopf-Theis T, Marks DC. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. *Cryobiology* 2011; 62: 100-106
77. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 227-234
78. Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL. Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Oper Tech Orthop* 2012; 22: 33-42
79. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004; 25: 5387-5393
80. Yang L-C, Hu S-W, Yan M, et al. Antimicrobial Activity of Platelet-Rich Plasma and Other Plasma Preparations Against Periodontal Pathogens. *Journal Of Periodontology* 2014; 1-17
81. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989; 109: 429-440

82. Tengku BS, Joseph BK, Harbrow D, Taverne AA, Symons AL. Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod* 2000; 22: 475-487
83. Brudvik P, Rygh P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. *Eur J Orthod* 1993; 15: 249-263
84. Ren Y, Maltha JC, Van 't Hof MA, Kuijpers-Jagtman AM. Age effect on orthodontic tooth movement in rats. *J Dent Res* 2003; 82: 38-42
85. Hakimi M, Jungbluth P, Sager M, et al. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury* 2010; 41: 717-723
86. Hakimi M, Grassmann JP, Betsch M, et al. The composite of bone marrow concentrate and PRP as an alternative to autologous bone grafting. *PLoS One* 2014; 9: e100143
87. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 1176-1181
88. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 529-535
89. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71: 1654-1661
90. Tozum TF, Dini FM. Treatment of adjacent gingival recessions with subepithelial connective tissue grafts and the modified tunnel technique. *Quintessence Int* 2003; 34: 7-13
91. Miyagawa A, Chiba M, Hayashi H, Igarashi K. Compressive force induces VEGF production in periodontal tissues. *J Dent Res* 2009; 88: 752-756
92. Cheung WY, Liu C, Tonelli-Zasarsky RML. Osteocyte apoptosis is mechanically regulated and induces angiogenesis in vitro. *J Orthop Res* 2011; 29: 523-530
93. Niida BS, Kaku M, Amano H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colonystimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 1999; 190: 293-298

94. Kohno S, Kaku M, Kawata T, et al. Neutralizing effects of an anti-vascular endothelial growth factor antibody on tooth movement. *Angle Orthod* 2005; 75: 797-804
95. Kanzaki H, Chiba M, Sato A, et al. Cyclical tensile force on periodontal ligament cells inhibits osteoclastogenesis through OPG induction. *J Dent Res* 2006; 85: 457-462
96. Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, et al. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1924-1934
97. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 1996; 75: 562-567
98. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 355-362
99. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 2002; 73: 925-936
100. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 432-438
101. Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, et al. Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone morphogenetic proteins production and decreasing their antagonists production by Saos-2 cells. *Life Sci* 2006; 78: 2697-2706
102. Govoni KE, Baylink DJ, Mohan S. The multi-functional role of insulin-like growth factor binding proteins in bone. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 261-268
103. Reijnders CM, Bravenboer N, Tromp AM, Blankenstein MA, Lips P. Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-I gene expression in rat tibia. *J Endocrinol* 2007; 192: 131-140
104. Hirukawa K, Miyazawa K, Maeda H, et al. Effect of tensile force on the expression of IGF-I and IGF-I receptor in the organ-cultured rat cranial suture. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 367-372

105. Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82: 454-459
106. Kheralla Y, Gotz W, Kavarizadeh A, Rath-Deschner B, Jager A. IGF-I, IGF-IR and IRS1 expression as an early reaction of PDL cells to experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 215-222
107. Kawaguchi H, Chikazu D, Nakamura K, Kumegawa M, Hakeda Y. Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 466-473
108. Nakajima R, Yamaguchi M, Kojima T, Takano M, Kasai K. Effects of compression force on fibroblast growth factor-2 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand production by periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Res* 2008; 43: 168-173
109. Li Y, Zheng W, Liu JS, et al. Expression of osteoclastogenesis inducers in a tissue model of periodontal ligament under compression. *J Dent Res* 2011; 90: 115-120
110. Bosetti M, Leigheb M, Brooks RA, Boccafoschi F, Cannas MF. Regulation of osteoblast and osteoclast functions by FGF-6. *J Cell Physiol* 2010; 225: 466-471
111. Alves JB, Ferreira CL, Martins AF, et al. Local delivery of EGF-liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. *Life Sci* 2009; 85: 693-699
112. Guajardo G, Okamoto Y, Gogen H, et al. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in cat paradental tissues during tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000; 118: 210-219
113. Kang Z-m, Huang S-g, Zhang J-x, Xiong P-y, Zhong X-h. Expression of platelet-derived growth factor AA in rabbit periodontal tissue during orthodontic tooth movement. *China Journal of Modern Medicine* 2005; 20:
114. Ren Y, Maltha JC, AM K-J. The rat as a model for orthodontic tooth movement- a critical review and proposed solution. *Eur J Orthod* 2004; 26: 483-490
115. Steigman S, Michaeli Y, Yitschaky M, Schweizer B. Dynamics of tissue changes found after mechanical loading of the rat incisor. I. A three-dimensional longitudinal study of the morphologic aspects. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 99: 533-542

116. Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 281-294
117. Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Takiguchi H. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. *Ann Periodontol* 1998; 3: 350-369
118. Kabasawa M, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Effect of age on physiologic and mechanically stressed rat alveolar bone: a cytologic and histochemical study. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 1996; 11: 313-327
119. Vavken P, Saad FA, Murray MM. Age dependence of expression of growth factor receptors in porcine ACL fibroblasts. *J Orthop Res* 2010; 28: 1107-1112
120. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 2000; 26: 282-291
121. Bawa S. The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. *J Osteoporos* 2010; 2010: 891058
122. Raisz LG. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *World Rev Nutr Diet* 1993; 72: 92-101
123. Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Influences of ovariectomy on experimental tooth movement in the rat. *J Dent Res* 2001; 80: 1858-1861
124. Altan B. Diyet lazer kullanımının ortodontik diş hareketi hızı üzerindeki etkilerinin deneysel olarak incelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2010:
125. Lee WC. Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement--with particular emphasis on the relationship to the method of PGE1 administration. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1990; 98: 231-241
126. Boisson M, Gianelly AA. Collagen synthesis in rat gingiva during tooth movement. *Am J Orthod* 1981; 80: 289-299
127. Kvinnsland S, Heyeraas K, Ofjord ES. Effect of experimental tooth movement on periodontal and pulpal blood flow. *Eur J Orthod* 1989; 11: 200-205
128. Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 1999; 69: 151-158

129. Engstrom C, Noren JG. Effects of orthodontic force on enamel formation in normal and hypocalcemic rats. *J Oral Pathol* 1986; 15: 78-82
130. Utley RK. The activity of alveolar bone incident to orthodontic tooth movement as studied by oxytetracycline-induced fluorescence. *Am J Orthod* 1968; 54: 167-201
131. Storey E. Tissue response to the movement of bones. *Am J Orthod* 1973; 64: 229-247
132. Alvarez Rodriguez L, Steimetz T, Ubios AM, Cabrini RL. An original orthodontic appliance for experimental mesial movements in rats. *Acta Odontol Latinoam* 1996; 9: 45-49
133. Konoo T, Kim YJ, Gu GM, King GJ. Intermittent force in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2001; 80: 457-460
134. van Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, van 't Hof MA. The effect of retention on orthodontic relapse after the use of small continuous or discontinuous forces. An experimental study in beagle dogs. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 111-116
135. Pilon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996; 110: 16-23
136. Collins KM, Sinclair MP. The local use of vitamin D3 to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.* 1988; 94(4): 278-284
137. Steigman S, Michaeli Y, Weinreb M, Jr. Structural changes in the dental and periodontal tissues of the rat incisor following application of orthodontic loads. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1987; 91: 49-56
138. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 56-59
139. 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
140. Brady TA, Piesco NP, Buckley MJ, et al. Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor-beta1. *J Dent Res* 1998; 77: 1779-1790

141. Zhang Y, Duan Y, Yu Q. The expression of transforming growth factor beta 1 in rat alveolar bone during orthodontic tooth movement. *Chinese Journal of Conservative Dentistry* 2001; 6:
142. Verna C, Dalstra M, Melsen B. The rate and the type of orthodontic tooth movement is influenced by bone turnover in a rat model. *Eur J Orthod* 2000; 22: 343-352
143. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 297-300; discussion 300-291
144. Okuda K, Kawase T, Momose M, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74: 849-857
145. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-1508
146. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14: 357-362
147. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-228
148. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34: 665-671
149. Soyulu SM. Rat fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*:
150. Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang L.N. Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates. 48th Meeting of the Orthopedic Research Society; Boston, MA2002.
151. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 212-219

152. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 2008; 36: 1171-1178
153. Mooren RE, Hendriks EJ, van den Beucken JJ, et al. The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 3159-3172
154. Ranly DM, McMillan J, Keller T, et al. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 2052-2064
155. Han B, Woodell-May J, Ponticiello M, Yang Z, Nimni M. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91: 1459-1470
156. Bausset O, Magalon J, Giraudo L, et al. Impact of local anaesthetics and needle calibres used for painless PRP injections on platelet functionality. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014; 4: 18-23
157. Brudvik P, Rygh P. Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence. *Eur J Orthod* 1995; 17: 177-188
158. Caceres M, Martinez C, Martinez J, Smith PC. Effects of platelet-rich and -poor plasma on the reparative response of gingival fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 1104-1111
159. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992; 63: 515-525
160. Weibrich G, Gnoth SH, Otto M, Reichert TE, Wagner W. [Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2002; 6: 168-174
161. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 60-70
162. Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 297-301

163. Hamdan AA, Loty S, Isaac J, et al. Platelet-poor plasma stimulates the proliferation but inhibits the differentiation of rat osteoblastic cells in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 616-623
164. Hashimoto F, Kobayashi Y, Matakai S, et al. Administration of osteocalcin accelerates orthodontic tooth movement induced by a closed coil spring in rats. *Eur J Orthod* 2001; 23: 535-545
165. Iino S, Sakoda S, Ito G, et al. Acceleration of orthodontic tooth movement by alveolar corticotomy in the dog. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007; 131: 448 e441-448
166. Ogino Y, Ayukawa Y, Kukita T, Atsuta I, Koyano K. Platelet-rich plasma suppresses osteoclastogenesis by promoting the secretion of osteoprotegerin. *J Periodontal Res* 2009; 44: 217-224
167. Cenni E, Avnet S, Fotia C, Salerno M, Baldini N. Platelet-rich plasma impairs osteoclast generation from human precursors of peripheral blood. *J Orthop Res* 2010; 28: 792-797
168. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, et al. Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 747-752
169. Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 229-234
170. Darendeliler MA, Sinclair PM, Kusy RP. The effects of samarium-cobalt magnets and pulsed electromagnetic fields on tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 107: 578-588
171. Blechman AM, Steger ER. A possible mechanism of action of repelling, molar distalizing magnets. Part I. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 108: 428-431

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc. Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 13.03.2013

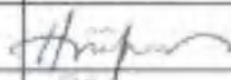
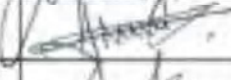
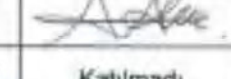
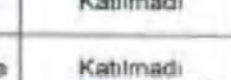
Toplantı Sayısı: 03

Karar No: 13/54

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul 13.03.2013 tarihinde

Prof .Dr. Harun ÖLGER

Başkanlığında toplanmıştır.

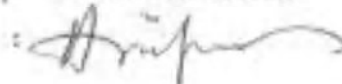
Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ölger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Candöz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Füsun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Gökçen Y. Çelik	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Aydın Alan	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Diş Fakültesinden Yrd. Doç. Dr. Ahmet YAĞCI tarafından sunulan "Trombositten Zengin Ve Fakir Plazmanın Ortodontik Diş Hareketi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi

Tarih : 13.03.2013

Etik Kurul Başkanı : Prof .Dr. Harun ÖLGER

İmzası :



ASLINDAYDIR

Prof. Dr. Harun ÖLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sibel AKBULUT

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 26/11/1983, Amasya

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 352 207 66 66 -29100

e-mail: sibelakbulut@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı 38039
Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Diş Hek. Fak.	2006
Lisans	Ankara Üniversitesi Diş Hek. Fak.	2006
Lise	Amasya Anadolu Lisesi, Amasya	2001

YABANCI DİL

İngilizce, Almanca

YAYINLAR

Balcı Yüce H, Akbulut N, Akbulut S, Demiralp KÖ, Karaca Z, Orhan K. The effect of ankaferd blood stopper on early bone tissue healing in extraction sockets: An experimental in vivo study. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015.

