

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**Betül (DİNÇER) TEMEL**

**DOĞAL VE SENTETİK BİOMATERYALLERDE, OSTEOGENIC (rhBMP-7)  
VE ANGIOGENIC (bFGF) BÜYÜME FAKTÖRLERİ İLE İNSAN  
OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2006**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL VE SENTETİK BİOMATERYALLERDE, OSTEOGENIC (rhBMP-7)  
VE ANGIOGENIC (bFGF) BÜYÜME FAKTÖRLERİ İLE İNSAN  
OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**Betül (DİNÇER) TEMEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez ....../....../2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği /  
Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

İmza

Yrd. Doç. Dr. Sema DÜZENLİ  
DANIŞMAN

İmza

Prof. Dr. Yahya AÇIL  
ÜYE

İmza

Prof. Dr. İskender EMRE  
ÜYE

İmza

Prof. Dr. Emin ESEN  
ÜYE

İmza

Prof. Dr. Mustafa CANLI  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Jeoloji Mühendisliği Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

**Kod No:**

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ  
Enstitü Müdürü**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu'ndaki hükümlere tabidir.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>III</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>IV</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>V</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Büyüme Faktörleri.....	3
1.1.1. Kemik Morfogenetik Faktör.....	4
1.1.2. Fibroblast Büyüme Faktörü .....	5
1.2. Kollajen.....	6
1.2.1. Kollajen biosentezi.....	7
1.2.2. Kollajen yıkımı.....	9
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>13</b>
3.1. Hücre kültürü.....	13
3.1.1 Besin maddesinin hazırlanması.....	13
3.1.2 Primer kültür hazırlanması.....	14
3.1.3 Hücre ekimi.....	14
3.1.4 Büyüme faktörlerinin ve Kemik yedek materyallerinin hazırlanması.....	14
3.1.5 Hücre sayımı.....	15
3.1.6 Deney Düzenineğinin Hazırlanması.....	16
3.2 MTT Testi (Cell Proliferation Kit I, Roche).....	17
3.3 Raster elektron mikroskobu (REM).....	18
3.3.1 Hücrelerin tespiti ve Dehidratasyonu.....	18
3.3.2 Kritik nokta kurutması ve Altın kaplama (Sputtern).....	18
3.3.3 Raster elektron mikroskobunda çalışmak.....	19

3.4	Örneklerin Sodyumdodesilsülfat-Poliacrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ve HPLC için hazırlanması.....	20
3.4.1	Proteinlerin saflaştırılması (Kollajen ekstraksiyon) ve Lyophilisation (su çekme).....	21
3.4.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid jel elektrophorezi (SDS-PAGE).....	23
3.4.3	Elektroforezde kullanılan jel boyama teknikleri.....	25
3.5	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC Yöntemi).....	26
3.5.1	CF-1'in (Fibröse selülöz) Hazırlanması.....	27
3.5.2	HPLC-Analizi için örneklerin hazırlanması ve Hidroliz.....	28
3.5.2.1	Adsorpsiyon kromatografisi.....	29
3.5.2.2	HPLC ile örneklerin analizi.....	30
3.5.2.3	Hidroksiprolin analizi.....	31
3.6	ELISA.....	32
3.6.1	VEGF analizi.....	32
3.6.2	BMP-2.....	32
3.6.3	BMP-4.....	33
<b>4.</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>35</b>
4.1.	SDS-PAGE.....	35
4.2	MTT.....	38
4.3.	Elisa sonuçları .....	38
4.4.	Farklı kemik yedek materyallerinde, değişik konsantrasyonlarda rhBMP-7 ve bFGF büyüme faktörleri uygulanan hücrelerin Raster Elektron Mikroskobundan elde edilen sonuçları.....	40
4.5	HPLC analizi sonuçları (hücrelerin farklılaşma durumu).....	41
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>43</b>
	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>54</b>

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### DOĞAL VE SENTETİK BİOMATERYALLERDE, OSTEOGENIC (rhBMP-7) VE ANGIOGENIC (bFGF) BÜYÜME FAKTÖRLERİ İLE İNSAN OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ

Betül TEMEL

Çukurova Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr.Sema DÜZENLİ  
Yıl : 2006, Sayfa: 54

Jüri : Prof. Dr. Yahya AÇIL  
Prof. Dr. İskender EMRE  
Prof. Dr. Emin ESEN  
Prof. Dr. Mustafa CANLI

Bu çalışmada amaç ksenojenik (Bio-Oss<sup>®</sup>, Geitslich Sons Ltd Wolhusen, Switzerland) ve alloplastik materyallerden oluşmuş (Chronos<sup>®</sup>, Synthes ve Osteovit<sup>®</sup>, Braun) kemik materyallerinin, değişik oranlarda uygulanan osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile osteoblastlar üzerine olan etkilerini karşılaştırmaktır.

Araştırma bir, iki ve dört haftalık üç ana grupta yürütülmüştür. Her kemik materyali grubunu, büyüme faktörlerinin her birinden 100 ng/ml ve 50 ng/ml eklenecek şekilde dört gruba, her iki faktörden 50 ng/ml eklenecek şekilde bir gruba ve hiç büyüme faktörü içermeyen kontrol grubu olmak üzere altı alt gruba ayrılmıştır. Haftada bir kez ELISA için, iki kezde Kolejen ekstraksiyon için besin maddeleri toplanmıştır. Birinci, ikinci ve dördüncü hafta sonunda kemik materyalleri fixe edilerek rasterelektronmikroskopunda incelenmiştir.

Elde edilen verilere bakıldığında Bio-Oss<sup>®</sup> ta ilk günden yeni kemik oluşumu başlamış, Osteovit<sup>®</sup> te osteoblastlar birden değil zaman içinde yavaş yavaş gelişme göstermişlerdir. Chronos<sup>®</sup> ta ise deneme süresince aynı oranda, diğer gruplara oranla daha yavaş ve az yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir. Ortalama olarak Bio-Oss<sup>®</sup> ta 50 ng/ml rhBMP-7, Osteovit<sup>®</sup> te 100 ng/ml bFGF, Chronos<sup>®</sup> ta ise 50 ng/ml bFGF verilen kültürlerde sonuçların yüksek olduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız inceleme sonucunda, materyalin seçiminin belirlenmesinde materyalinin yapısı, fiziksel özellikleri, osteoindüktif, osteokondüktif etkisinin ve kullanılan büyüme faktörlerinin oranlarının değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kemikyedekmateryalleri, rhBMP-7, bFGF

## **ABSTRACT**

**MSc THESIS**

### **EFFECT OF OSTEOGENIC AND ANGIOGENIC GROWTH FACTORS ON HUMAN OSTEOBLAST-CELLS ON NATURAL AND SYNTHETIC BIOMATERIALS**

**Betül TEMEL**

**UNIVERSITY OF ÇUKUROVA  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

**Supervisor : Yrd. Doç. Dr.Sema DÜZENLİ  
Year : 2006, Pages: 54**

**Jury : Prof. Dr. Yahya AÇIL  
Prof. Dr. İskender EMRE  
Prof. Dr. Emin ESEN  
Prof. Dr. Mustafa CANLI**

With the developing technology, new methods and new biomaterials have been produced for the repairing of bone defects. In this article, we have aimed to find out the appropriate materials for the repair of different bone defects. The aim of this study is to evaluate and compare the effects of xenograft (Bio-Oss®, Geitslich Sons Ltd Wolhusen, Switzerland), and alloplastic bone graft materials (chronos®, Synthes ve Osteovit®, Braun) with growth factor on osteoblast.

This study has gone one, two and four weeks over three main groups. All bone material groups have received several growth factors 100 ng/ml and 50 ng/ml, so that we built four groups. We put 50 ng/ml from these two factors to one of the groups and to the non-grown control group, so we have six groups. Once a week for ELISA and twice we collect the collagen extracts. After the first, second and fourth week we prepare the bone material for the rasterelectronicmicroscope.

When we look at Bio-Oss then we see growing bone already on the first day. In the Osteovit, we see that the growing rate from osteoblasts is not fast, they grow step by step. If we look at chronos, we will see, that we have in the same time a very small growing rate of bone compared to the similar groups. In the middle, if we put in an average Bio-Oss 50 ng/ml rhBMP-7, Osteovit 100 ng/ml bFGF, chronos 50 ng/ml bFGF so we see growing of the cultures more then we expected.

As a result, we believe that, the physical, osteoinductive, osteoconductive properties of graft material should be considered, as well as the place and dimensions of the defect, to use the appropriate graft material.

**KeyWords: Bone carrier material, rhBMP-7, bFGF**

## **TEŞEKKÜR**

Tezimin yürütülmesi ve değerlendirilmesinde gösterdiği yardımlardan dolayı danıőmanım Yard. Doç. Dr. Sema DÜZENLİ' ye teşekkür ederim.

Ayrıca Christian Alberts Üniversitesi, Diş, Ağız, Çene ve Yüz Cerrahisi Kliniği Araştırma Laboratuvarları sorumlusu Prof. Dr. rer. nat. Yahya AÇIL' a ve Dr. Roldan' a gerek çalıőmalarım esnasında yardımlarından dolayı, gerekse konuyla ilgili bilgilerini benden esirgemediği için teşekkür ederim. Tez çalıőmalarım süresince bana destek olan biricik eőim, canım oğlum ve aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b>Çizelge 3.1.</b> Büyüme faktörlerine ait bilgiler.....	15
<b>Çizelge 3.2.</b> Kullanacak büyüme faktörlerinin oran tablosu.....	15
<b>Çizelge 3.3.</b> Kemik greftlerine ait bilgiler.....	15
<b>Çizelge 3.4.</b> Kollajen ekstrasyon aşamalarını gösteren diagram.....	20
<b>Çizelge 3.5.</b> VEGF analizi standart konsantrasyonları.....	32
<b>Çizelge 3.6.</b> BMP-2 analizi standart konsantrasyonları.....	33
<b>Çizelge 3.7.</b> BMP-4 analizi standart konsantrasyonları.....	33
<b>Çizelge 4.8.</b> 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrollere göre en yüksek BMP-2 üreten değişik kemik yedek materyallerinin kültürleri .....	38
<b>Çizelge 4.9.</b> 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrollere göre en yüksek BMP-4 üreten değişik kemik yedek materyallerinin kültürleri .....	39
<b>Çizelge 4.10.</b> 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrollere göre en yüksek VEGF üreten değişik kemik yedek materyallerinin kültürleri .....	40
<b>Çizelge 4.11.</b> Aynı kemik yedek materyalinde, aynı zaman aralığında, değişik konsantrasyonlarda hücrelere verilen büyüme faktörlerinin gelişim sıralamaları.....	40
<b>Çizelge 4.12.</b> Farklı kemik yedek materyallerinde değişik konsantrasyonlarda hücrelere verilen büyüme faktörlerinin aynı zaman aralığındaki gelişim sıralamaları.....	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1</b> Büyüme faktörlerinin etki mekanizmaları. Büyüme faktörleri (•) spesifik reseptörler aracılığı ile üretildikleri hücrede (otokrin, intrakrin tarz) veya diğer hücreler üzerinde (parakrin, jukstakrin veya endokrin tarz) etki gösterirler (McKay, 1993; Özgeç, 2004).....	3
<b>Şekil 1.2.</b> Kollajen fiberlerinin genel görüntüsü (üstte) (Kielty et al. 1993).....	6
<b>Şekil 3.3.</b> İnsan osteoblast hücreleri, 7-9 günlük hücre kültürü inkübasyonu (10´ luk objektifte).....	13
<b>Şekil 3.4.</b> Hücre kültürü kabı.....	16
<b>Şekil 3.5.</b> Crosslinks Hydroxylysylpyridinolin (HP) ve Lysylpyridinolin (LP) (Knott ve Bailey 1998).....	29
<b>Şekil 4.6.</b> SDS-PAGE <b>Osteovit</b> <sup>®</sup> sonucu.....	36
<b>Şekil 4.7.</b> SDS-PAGE <b>Bio-Oss</b> <sup>®</sup> sonucu .....	37
<b>Şekil 4.8.</b> SDS-PAGE <b>Chronoss</b> <sup>®</sup> sonucu .....	37

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>APS</b>	Amonyumpersülfat
<b>CF-1</b>	fibröz Selüloz
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMEM</b>	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
<b>EDTA</b>	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
<b>HAc</b>	% 0,5 seyreltilmiş asetik asit
<b>hOB</b>	insan osteoblastları
<b>HP</b>	Hydroxylsilylpyridinolin
<b>HPLC</b>	Yüksek Performans sıvı kromatografisi, High Performance Liquid Chromatographie
<b>Hyp</b>	Hydroxypyrolin
<b>I.E.</b>	Internationale Einheiten
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidjellelektroforezi
<b>PBS</b>	phosphat buffered saline
<b>REM</b>	Raster elektron mikroskobu
<b>SDS</b>	Sodyumdodesilsülfat
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamin

## 1. GİRİŞ

Kemik, insan vücudunda yaralanma sonrası rejenerasyon yeteneğine sahip form ve fonksiyonunu yeniden oluşturabilen bir dokudur. Çok eski zamanlardan beri insanlar, hasta ya da zarar görmüş dokuları sağlıklı olanlarıyla transplantasyon yoluyla değiştirmeye çalışmışlardır (Fonseca ve Walker, 1997; Fonseca ve Davis, 1995). Günümüzde transplantasyonlarda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında otojen, allojen, ksenojen kemik greftleri ve membranlar klinikte en çok kullanılanlardır (Arıncı, 1999; Caffesse ve Nasjleti, 1992; Dahlin ve ark., 1994). Greft materyalleri ile meydana gelen rejenerasyonda, iki yöntem söz konusudur:

Osteoindüksiyon, klasik anlamda osteoblastik aktiviteyi artırarak kemik oluşumunun sağlanmasını ifade etmek için kullanılan bir terimdir (Fonseca ve Davis, 1995). Otojen greftler ve demineralize kemikler osteoindüktif etkiye sahiptir.

Osteokondüksiyon ise; defekt alanına yerleştirilen bir greft materyaline farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin invazyonu ile oluşan kırık dokunun yerine yeni kemik dokusunun geçmesi süreci için kullanılan bir terimdir. Sentetik kemik allogreftleri, osteokondüktif etkilidir ( Yazar, 1998; Fonseca ve Walker 1997).

Kemik defektlerinin tedavisi için kullanılan kemik greft materyallerini immünolojik orijinlerine göre şu şekilde sınıflayabiliriz ( Fonseca ve Walker 1997; Cranin ve ark., 1993).

### 1. Otojen greftler; aynı canlıdan alınan dokular

Otojen kemik greft materyalleri bütün kemik defektleri arasında en önce tercih edilmesi gerekli olanlardır. Yabancı cisim reaksiyonuna neden olmazlar. Osteoindüktiftirler. Bunun yanı sıra az da olsa osteoklastik etkileri de vardır ve daha kısa sürede vaskülarize olurlar ( Fonseca ve Davis, 1995; Ganz, 1997; Goulet ve ark., 1997; Martinez ve Walker, 1999; Pasetti , 1994; Polson ve Heijl, 1978).

### 2. Allojenik greftler (Allogreftler) veya implantlar; aynı türden fakat genetik olarak alıcıyla hiç bir benzerliği olmayan canlılardan alınan dokular

### 3. İzogen greft veya implantlar (İzogreft ya da Syngenesioplastıc graft); alıcı ile aynı genetik yapıya sahip canlılardan alınan dokular

4. Xenojenik implantlar (Xenogreftler); alıcıdan farklı bir türden olan vericiden alınan dokulardır.

Kemik kaynaklı greft materyallerinden taze dondurulmuş kemik, eklem bölgesinde osteokondral greft şeklinde kullanılabilir. Dondurulmuş kurutulmuş kemiğin, damarlanması yavaştır ve negatif immunolojik yanıtı neden olur. Materyalin, dondurulmuş kurutulmuş yapısı hücre ölümüne ve doku hasarına yol açabilir. Hazırlama işlemi esnasında  $-76^{\circ}\text{C}$  dondurulur. Demineralize kemik ise öncelikle osteoindüksiyonun ön planda olduğu durumlarda tercih edilir. Ancak greftin fiziksel özellikleri ve gerilim kuvvetlerine direnci düşüktür. Deproteinize edilmiş kemik antijenik özelliğini kaybeder. Sığır kemiğinden elde edilen ksenogreftlerin de kullanımı son yıllarda oldukça yaygınlık kazanmıştır. Osteojenik potansiyelini artırmak üzere otojen kemik iliğiyle karıştırılarak kullanılmasının yararlarından söz edilmiştir. Kalsiyum karbonat esaslı bir greft materyali olan hidroksi apatit, öncelikle kontur defektlerinde ve fonksiyonel olmayan bölgelerde kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat esaslı materyal olan trikalsiyum fosfat'ın kemikle yer değiştirebilme özelliği yanında yüksek rezorptif aktiviteside vardır (Fonseca ve Walker, 1997; Fonseca ve Davis, 1995; Gantes ve ark., 1991; Curtis ve Ware 1997).

"Greft" terimi canlı dokunun direkt transplantasyonu anlamında kullanılırken, "İmplant" terimi cansız dokuların transplantasyonunda kullanılmaktadır. Bu anlamda implant materyalleri olarak; canlılığını yitirmiş allojenik greft, hayvanlardan elde edilen organik ve inorganik cansız materyaller ve sentetik materyaller bulunmaktadır (Fonseca ve Davis, 1995). Sentetik materyal olarak; seramik hidroksilapatit implantları, trikalsiyum fosfat implantları, çeşitli metaller ve bunların farklı formlarıyla kombinasyonları sayılabilir. Bu maddelere "Alloplastik materyaller" denir (Fonseca ve Walker, 1991). Oral ve maksillofasiyal cerrahi uygulamalarda transplante edilebilen çeşitli doku tipleri içerisinde en genel kullanımı olan doku kemiktir. Kemik dokusu, tamir olayında skar dokusu oluşumundan çok, yeniden yapılanma ve yer değiştirme olaylarının rol oynadığı tek dokudur.

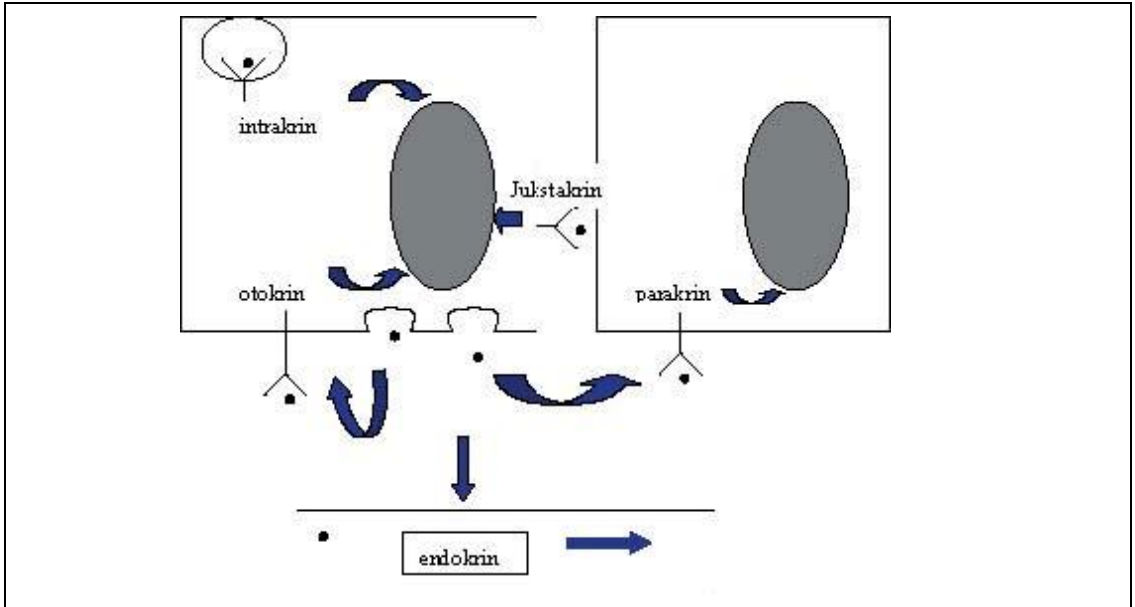
Kemik greftlerinin osteogenezisi artırması iki yolla gerçekleşebilir;

i. osteoblastları ya da osteoblastlara dönüşebilecek canlı hücreleri koruyarak

ii. alıcı dokuyu osteoblastların sayısını artırıcı şekilde indükleyerek. Daha fazla osteoblast elde etmek için greft alırken periostu (kemik derisi) da beraberinde almak bir süre için popülerite kazanmışsa da bu yöntemle çok az sayıda osteoblast elde edildiği görüldüğünden yöntemden vazgeçilmiştir. Otojen kortikal greftler de canlı osteoblast sağlama yönünden zayıftırlar (Peterson ve ark., 1992).

### 1.1 Büyüme Faktörleri

Gelişmenin olduğu büyüme ve farklılaşma evrelerinde çok sayıda faktör etkili olmakta, hücre sayısının çoğalması olaylarının başlamasında ise büyüme faktörleri temel rolü oynamaktadır (Burçak, 2002). Büyüme faktörlerinin etki şekilleri Şekil 1.1’ de gösterilmiştir (McKay, 1993). Jukstakrin etki mekanizmasında; büyüme faktörleri sentezlendikleri hücrelerin plazma membranına bağlanarak doğrudan bitişik hücreyi etkileyerek biyolojik aktivitelerini gösterebilirler. Jukstakrin kontrolün bir şeklini de hücre dışı matriks için yüksek etkileşime sahip büyüme faktörleri göstermektedir. Bu etki şekline, heparin bağlayan büyüme faktörleri olan fibroblast büyüme faktörleri örnek verilebilir (McKay, 1993).



**Şekil 1.1** Büyüme faktörlerinin etki mekanizmaları. Büyüme faktörleri (●) reseptörler aracılığı ile üretildikleri hücrede (otokrin, intrakrin tarz) veya diğer hücreler üzerinde etki gösterirler (McKay, 1993; Özgeç ve Yeler, 2003).

### 1.1.1 Kemik Morphogenetic Protein (BMP)

Kemik indüksiyonunu sağlayan proteinlerin izolasyonu ilk olarak 1979 yılında Urist tarafından gerçekleştirilmiş ve bu ürünün kemik morfogenetik aktivitesinin demineralize kemikten daha fazla olduğu görülmüştür. Bu proteinler Urist tarafından Bone Morphogenetic Protein veya Osteogenic Protein (OP) olarak isimlendirilmiştir (Alpaslan ve ark., 1994).

Yapılan çalışmalar; BMP'lerin birçok doku ve organın oluşumunda erken morfogenezis sırasında olan epitelial mezenşimal etkileşimlerde morfogenerler olarak rol oynadıklarını göstermiştir. BMP'ler transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) ailesinin üyesidir. Aminoasit diziliş benzerliklerine göre altgruplara ayrılmışlardır. BMP-2 ve 4 birinci altgrubu, BMP-5 ve 8 ikinci alt grubu oluşturmaktadır. BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'nin en etkin osteoindüktif özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler arasında bone morphogenetic protein-2'nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür (Levent ve ark., 1988). BMP'lerin heterotopik bölgelerde endokondral yol ile kemik formasyonu indüksiyonu yaptığı birçok hayvan çalışmasında gösterilmiştir (Akay ve ark., 1999; Archer, 1994; Urist ve ark., 1967).

BMP'lerin uygun bir taşıyıcı ile implante edildikleri zaman; undiferansiye mezenşimal hücrelerin kemotaksis ile aktive edilerek göçlerine ve osteoblastlara dönüşmelerine, kemik matriksi depolanmasına, yeni depo edilen kemik matriksinin mineralizasyonuna ve kemik iliği diferansiyasyonuna neden oldukları gösterilmiştir (Papacharalambous ve Anastasoff, 1993; Levent ve ark., 1988).

rhBMP-7 implantat yatağında demineralize allogen kemik grefti olarak diffüze olabilir ve kemik oluşumunu başlatabilir (Kübler ve Würzler, 1998, Reddi 1994). Bu oluşumda sırasıyla kemotaksis, mitoz ve farklılaşma gözlemlenir.

### 1.1.2 Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)

Fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast growth factors, FGFs), polipeptit büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadır. FGF'ler değişik organizmalarda (nematodlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede) bulunmaktadır (Ornitz ve Itoh, 2001).

Fibroblast büyüme faktör ailesinin, en az 9-22 tane yapısal ve biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösteren, 17-34 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip olan üyeleri mevcuttur; bununla birlikte *Drosophila* türünde FGF molekül ağırlığı 84 kDa'dur ( Boyne ve ark.,1998; Boyne, 2001). Omurgalılarda gen yapısı ve amino asit sırası (özellikle reseptöre bağlanma alanları) bakımından FGFs yüksek oranda korunmuşlardır (Ornitz ve Itoh, 2001). FGFs çeşitli mezoderm ve öroektoderm'den türeyen hücreler (fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreler, kondrositler, melanositler gibi) için kuvvetli mitojenik aktiviteleri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlama özellikleri ile karakterize edilmişlerdir (Cochran ve ark., 1999). Çok bilinen iki FGF'ler izoelektrik noktalarının (pI) farklı olması nedeni ile birbirinden ayırt edilmiştir. Asidik FGF (aFGF, FGF-1; 15 kDa)'nin pI 4.5-6, bazik FGF (bFGF, FGF-2)'nin ise pI 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörü % 55 sıra benzerliğine sahiptir (Fleet ve ark., 1996; Boyne, 2001). Yapılan bir araştırmada beyin ve hipofiz ekstrelerinin FGF'i içerdiği bulunmuştur (Fujimoro ve ark., 2001). Hipofiz mitojenik faktörlerin major sentez alanıdır. bFGF ilk defa sığır hipofiz ve daha sonra ise sığır beyin ekstrelerinden saflaştırılmıştır (Gordh ve ark., 1999; Howell ve ark., 1997).

bFGF; çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. bFGF öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF dokuların rejenerasyonunda etkilidir (Ma ve ark., 2000).

## 1.2 Kollajen

İnsan vücudundaki tüm proteinlerin üçte bir kadarını oluşturan bağ doku proteinlerinden biridir. Üçlü heliks şekline sahip ve her zincirinde 1400'den fazla amino asit bulunduran protein çeşididir. Genellikle deride bulunur hatta derimizin yaklaşık % 75'i kollajenden oluşmuştur. Şu anki bilgilere göre vücudumuzda, 35 tip kollajen ve kollajenin ayırık parçalarına benzeyen daha küçük moleküller bulunmaktadır. Kollajen, kemiğin çabuk kırılmasını önler.

Kollajen, tendonlarda (kaslarda ), kıkırdakta, kemiklerin organik matriksinde ve gözün korneasında önemli miktarlarda bulunan basit, fibriler skleroproteindir. Kollajen, hayvanlar aleminde çok yaygındır; memeli hayvanların vücut ağırlığının %6'sını, tüm vücut proteinlerinin % 30'unu oluşturur (Alberts ve ark. 1995).

Kollajen moleküllerinin en belirleyici özelliği, üç polipeptit alt biriminden oluşan bükülmüş kangal olan üçlü sarmaldır. Şekil 1.2'de gösterildiği gibi polipeptit alt birimler olan  $\alpha$ -zincirler, bir ortak eksen etrafında dönerek 3000 Å (300 nm; 10 Å= 1 nm) uzunluğunda ve 15 Å çapında katı bir çubuk benzeri bir molekül yapar; bunlar fibrilleri oluştururlar; fibriller de agregre olarak fiberleri oluştururlar (Kielty ve Würzler, 1998).

Kollajenin yapısını oluşturan fibriller ve fiberler, Şekil 1.2'de şematik olarak gösterildiği gibi deride ve tendonlarda birbirine paralel demetler halinde, akciğerlerde düzensiz bir şekilde, korneada ortogonal tabakalar halinde, kıkırdakta gevşek ağ yapısında, kemik ve dişlerde kalsiyum fosfat kristalleri için matriks oluşturacak şekilde yerleşirler.



**Şekil 1.2.** Kollajen fiberlerinin genel görüntüsü (üstte) (Kielty ve ark.. 1993)

Kollajen, soğuk suda çözünmez, sıcak suda ve sulu asit ve alkalilerle kaynatmakla jelatin oluşturur; jelatin de suda kolaylıkla çözünerek koloidal jel çözeltileri oluşturur.

Kollajen, bulunduğu dokulara dayanıklılık verir, doku şeklini korur ve dokuya gerilme direnci sağlar. Kollajen, kanın pıhtılaşmasında etkilidir; kan pıhtısı ile etkileşerek yara deliğini kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğü halde kollajen lifleri ağı zedelenme yeri üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter. Kollajen, yaraların iyileşmesinde de rol oynar. Kollajen, kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kıkırdağı, 9:1 oranında elastin alarak tendonları, kendinin 4 katından daha fazla hidrate kalsiyum fosfat alarak kemikleri oluşturur; deride ise kendi kadar dermatan sülfat ve 9:1 oranında elastinle birlikte dir.

### 1.2.1 Kollajen Biyosentezi

Kollajen, bir ekstrasellüler protein olmakla birlikte, olgun bir kollajen lifi haline gelmeden önce bağ doku fibroblastlarında, intrasellüler prekürsör molekül halinde sentezlenir.

Fibroblastlarda en önce ortaya çıkan kollajen prekürsörü, N-terminalinde yaklaşık 100 amino asitlik bir sinyal dizisi içeren **preprokollajen**dir. Preprokollajen, endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlar tarafından meydana getirilir. Preprokollajenin N-terminali endoplazmik retikulumun veziküler aralığına girdikçe sinyal sıralaması ayrılır ve molekül ağırlığı 150000 kadar olan **prokollajen** oluşur (Kielty ve ark.. 1993).

Prokollajen, endoplazmik retikulumun veziküler aralığında modifiye edilir. Bu modifikasyon, polipeptit yapısı içindeki prolin ve lizin kalıntılarının hidroksillenerek hidroksiprolin ve hidroksilizin haline dönüşmesini, hidroksilizin kalıntılarının galaktozlanmasını, disülfid bağlarının ve üçlü sarmalın oluşması işlemlerini kapsar.

Prolin kalıntılarının hidroksiprolin kalıntısına dönüşümü, prolil-4-hidroksilaz veya prolil-3-hidroksilaz enzimleri tarafından katalizlenir. Prolil-4-hidroksilaz, (Gly-X-Y)<sub>n</sub> polipeptidinde Y konumunda olan prolin kalıntıları üzerine etki ederek 4-hidroksiprolin kalıntıları haline dönüştürür ki bunun için  $\alpha$ -ketoglutarat, O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> ve

askorbat gerekmektedir: Prolil-3-hidroksilaz, Y konumundaki bir 4-hidroksiprolinin hemen öncesindeki X konumundaki prolin kalıntıları üzerine etki eder. Lizin kalıntılarının hidroksillenmesi, lizil hidroksilaz etkisiyle olur. Daha sonra hidroksilizin kalıntıları, UDP'ın galaktozil veya glukozil taşıyıcısı olarak kullanıldığı reaksiyonlarda, galaktozil transferaz ve glukozil transferaz etkisiyle galaktozillenir ve glukozillenirler.

Prokollajen, N-terminalinde 20 Dalton ve C-terminalinde 30-35 Dalton iki peptit içerir. Prokollajen molekülünün iki ucunda bulunan peptitlerdeki sistein kalıntıları, N-terminalde zincir içi, C-terminalde ise hem zincir içi hem zincirler arası disülfid bağları oluştururlar ve prokollajen molekülleri üçlü sarmal halinde biraraya gelirler. İntrasellüler modifikasyondan sonra, hidroksillenmiş ve glikozillenmiş prokollajen molekülü, Golgi kompleksi yoluyla hücre dışına salgılanır. Hücre dışına salgılanan prokollajenin N-terminal ve C-terminal peptitleri, sırasıyla prokollajen aminoproteaz ve prokollajen karboksiproteaz enzimleri tarafından ortadan kaldırılır ve **tropokollajen** oluşur. Tropokollajen molekülleri, her zincirde yaklaşık 1000 amino aside sahiptirler ve dokularda bulunan olgun kollajen fibrilleri gibi lifler halinde spontan toplanırlar. Bununla birlikte bazı fibriller bir dizi kovalent bağ vasıtasıyla çapraz bağlanmadıkça olgun kollajen fibrillerinin gerilme gücüne sahip değildirler (Kielty ve ark. 1993).

Kollajende çapraz bağların oluşumu için önce ekstrasellüler bir enzim olan ve bakır içeren lizil oksidaz, kollajenin belirli lizil ve hidroksilizil kalıntılarının  $\epsilon$  amino gruplarını oksidatif olarak deamine ederek allizin ve hidroksiallizin gibi reaktif aldehytleri oluşturur. Daha sonra bu aldehytler, başka liziller veya hidroksiliziller ve hatta glikozillenmiş hidroksilizillerin  $\epsilon$  amino grupları ile Schiff bazı ( $-N=CH-$ ) yaparlar. Bu Schiff bazları da kimyasal olarak yeniden düzenlenirler ve yeni peptit bağları veya sekonder amino köprüleri gibi kovalent çapraz bağlantılar sağlarlar. Ayrıca aldol köprüleri de intramoleküler çapraz bağlantılar sağlarlar ve böylece oluşan kollajen, yapısındaki çapraz bağlar nedeniyle son derece güç çözümlü hale geldiğinden kollajen lifleri halinde çöker. Kollajen salgılayan hücrelerden salgılanan fibronektin de çökmekte olan kollajen fibrillerine bağlanarak perisellüler matrikste fiber oluşumunun kinetiğini değiştirir (Yamauchi ve Katz 1993).

### 1.2.2 Kollajenin Yıkılıml

Kollajenin yarı ömrü birkaç gün kadardır. Kollajen, özel kollajenazlar tarafından, son derece yavaş olarak, glisin-lösin veya glisin-izölösün bağlantılarından yıkılır. Kollajenazlar, bazı proteolitik enzimlerle aktive edilirler;  $\alpha_2$ -makroglobulin ise önemli bir kollajenaz inhibitörüdür (Eyre 1981).

Katepsin B, çapraz bağlara yakın bölgelerdeki bağları parçalayarak sarmal yapının stabilitesini bozar ve proteolize yardım eder.

Kollajen, bir sindirim sistemi enzimi olan pepsin tarafından da yavaş olarak parçalanır. Kollajenin suda uzun süre veya asitte kısa süre kaynatılmasıyla oluşan jelatin, pepsinle çabucak parçalanır ki bu, pişirilen etin fibröz kısmının kolayca sindirildiğini gösterir; ancak, triptofan içermediğinden jelatinin besin değeri düşüktür (Alberts ve ark., 1995).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

**Urist (1967)**, Kemik indüksiyonunu sağlayan proteinlerin (Bone Morphogenetic Protein, BMP) izolasyonunu gerçekleştirmiş ve bu ürünün kemik morfogenetik aktivitesinin demineralize kemikten daha fazla olduğunu görmüştür.

**Dahlin ve ark. (1994)**, Çalışmalarında, mandibulalarında 5 mm genişliğinde transosseöz defektler oluşturulmuş deney hayvanlarına e-PTFE membran uygulaması ve 6 hafta sonra yaptıkları doku analizi neticesinde tüm deney hayvanlarında defektin tamamen iyileştiğini, e-PTFE membranların iyi tolere edildiğini bildirmişlerdir.

**Açıl ve Müller (1995)**, Yaptığı çalışmada kolajenlerin çapraz bağlantı elamanlarının izolasyonunu, analizini ve tıbbi önemini, birçok hücre kültürü ve biomateriyallerin biotoleranslarını araştırmıştır.

**Akay ve ark. (1999)**, Kist enükleasyonu ve apikal kök rezeksiyonu operasyonlarından sonra kemik defektlerine allogreft (Tutoplast®) uygulamışlar ve 1. hafta, ilk 3 ay, 6 ay ve 1. yılda klinik ve radyolojik muayeneler yapmışlardır. Yaptıkları inceleme sonucunda herhangi bir trabeküler anomali ve yabancı doku reaksiyonu saptamamışlardır.

**Howell ve ark. (1997)**, diş çekimi sonrası alveoler kemiğin korunması amacıyla ACS (Absorbable Collagen Sponge) taşıyıcı ile birlikte rhBMP-2 kullanmış ve sonuç olarak; rhBMP-2/ACS implantın lokal ve sistemik olarak ciddi yan etki oluşturmadan iyi tolere edilebildiğini ve insanlarda diş çekimi sonrası alveoler kretin korunmasında uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

**Hurzeler ve ark. (1998)**, 5 erişkin maymunun implant çevresindeki kemik kavitesine; bir gruba rezorbe olabilen membran, diğer gruba ise rezorbe olabilen membran + ksenogreft (Bio-Oss®, Geitslich Sons Ltd Wolhusen, Switzerland), diğer bir gruba da ePTFE + ksenogreft (Bio-Oss®, Geitslich Sons Ltd Wolhusen, Switzerland), son gruba da kontrol grubu olarak 6 ay sonra kemik oluşumunu incelemişlerdir. Dört grup arasında yeni kemik oluşumunun başlangıca oranla oldukça arttığını ancak grup 2 ve 3 arasında belirgin farklılık olmadığını ifade etmişlerdir.

**Schwartz ve ark. (1998)**, çalışmalarında Demineralized Bone Matrix (DBM)'nin kemik indüktif özelliklerinin az olmasının sebebinin yeterli miktarda BMP içermemesine bağlamışlardır.

**Wozney ve ark. (1988)**, BMP'nin DNA zincirinin klonlanmasını gerçekleştirmiş ve bu işlemle BMP'lerin rekombinant olarak istenilen miktarlarda üretilmesi sağlanmıştır.

**Bessho ve ark. (1999)**, tarafından yapılan çalışmada recombinant human bone morphogenetic protein-2'nin (rhBMP-2) ve insan kemik matriksinden pürüfiye edilerek elde edilen BMP-2'nin kemik indüktif özellikleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak recombinant olarak elde edilen BMP'nin pürüfiye olarak elde edilenin onda biri oranında aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

**Aybar ve ark. (2000)**, bu çalışmada Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR, Tutoplast®-Dura Biodynamics Int Deutchland, GmbH, Erlangen) ve YDR ile birlikte allojenik (Tutoplast®-Spongiosa-Pfrimmer-Viggo, Biodynamics, Inc, Germany) ve ksenojenik (Bio-Oss®, Geitslich Sons Ltd Wolhusen, Switzerland) kemik greftlerinin kemik defekti iyileşmesi üzerine olan etkilerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, YDR materyali olarak duramater kullanılan bu deneysel çalışmada, kemik defektlerinin onarımında YDR'nin tek başına kullanılmasının greftlerle birlikte uygulanmasından daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bu çalışmada, sıçan tibialarında açılan defektlere greft materyali olarak allogreft (Tutoplast®), ksenogreft (Bio-Oss®) ve yönlendirici doku rejenerasyon materyali olarak Duramater uygulamışlardır. Greft materyallerinin ikisinin de geç dönemde kemik trabeküllerinin oluşumunu artırdığını gözlemlemişlerdir. Ancak osteogenezi artırma yönünden allogreft ve ksenogreft arasında belirgin bir farklılık olmadığını gözlemlemişlerdir.

**Matin ve ark. (2001)**, taşıyıcı ile birlikte rhBMP-2'yi çekim sonrasında diş soketine yerleştirmişlerdir. Yapılan değerlendirme sonucunda rhBMP-2 uygulanan bölgede ilk direk kemik oluşumunu 5 gün sonra görmüşlerdir. Histomorfometrik değerlendirmede rhBMP-2'li bölgelerde kontrol grubuna göre total olarak daha fazla kemik rejenerasyonu oluştuğunu tespit etmişlerdir.

**Özgeç ve ark. (2003)**, büyüme ve diferansiyasyon faktörlerinin kullanımı ile iskelet dışı bölgelerde yeni kemik oluşumu sağlamışlardır. Temel olarak kemik grefti kullanım endikasyonu olan bütün durumlarda BMP kullanılması endikasyonu vardır. Bone morphogenetic protein kullanılarak elde edilen kemiğin autojenik ve allojenik greftlerin yerine kullanılması morbiditeyi ve bulaşıcı hastalıkların geçişini engelleyeceği sonucuna varmışlardır.

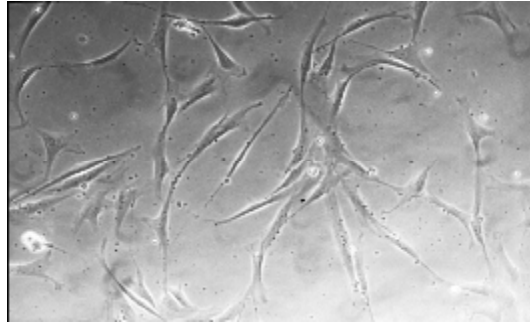
**Çetin ve Çapan (2004)**, bu çalışmada; taşıyıcı vektörün, bFGF'nin reseptörüne olan afinitesinde minimum düzeyde bir azalma meydana getirdiği, bununla birlikte bFGF'nin periferdeki organlar tarafından alınmasının azaldığı ve beyin içine alınmasında bir artış olduğu ve bFGF'nin reseptör aracılıklı olarak KBE'den beyne taşınmasının nöroprotektif ajan olarak bFGF'nin terapötik etkisini artırdığını tespit etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tezde kullanılan analizler Kiel Üniversitesi, Diş, Ağız, Çene ve Yüz Cerrahisi Kliniğinde Prof. Dr. rer. nat. Yahya AÇIL yönetimindeki araştırma laboratuvarlarında uygulanan metodlara göre yürütülmüştür.

#### 3.1 Hücre Kültürü

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) firmasından alınan insan osteoblast hücreleri kültür şişelerine ekilip, 4 hafta süresince hücreler üretilmiştir. Haftada 2 kez besin maddesi değiştirilip ve her değiştirmede şişelerde mantar veya bakteri üremesi kontrol edilmiştir. Kültür şişelerinde hücre çoğalmasından dolayı boş alan kalmayınca 7 ayrı şişeye ekim yapılmıştır.



**Şekil 3.3.** İnsan osteoblast hücreleri, 7-9 günlük hücre kültürü inkübasyonu (10<sup>1</sup>luk objektife)

##### 3.1.1 Besinmaddesinin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmaları Açıl ve ark.'a (2000) göre yapılmıştır. Hücrekültürü için hazırlanan besin maddesi 4,5 g D-Glukose ve 2 mM L-Glutamin ile 13,53 g/l konsantrasyondan oluşan Dulbecco's Modified Eagle's Medium'un (DMEM; Biochrom KG, Seromed, Berlin) 1 l saf suda çözündürülüp 3,7 g Sodyum hidrojen karbonat eklendikten sonra pH'nin 7,4'e NaOH ile ayarlanmasıyla elde edilmiştir.

Sonra bu çözelti por büyüklüğü 0,2 µm olan steril membran filtresinden geçirip steril edilmiştir. 1 l hazırlanan bu çözeltinin içine 100 ml Fetal Sığır Serum (FCS, % 10 olacak şekilde), 100 I.E./l Penicillin, 100 mg/L Streptomycin (Biochrom KG, Seromed, Berlin), 1 mmol/l Vitamin C ve 100 nmol/l Dexametasone eklenmiştir.

### **3.1.2 Primer Kültür Hazırlanması**

DSMZ firmasından alınan Osteoblast hücrelerinin primer kültürü literatürde yazdığı gibi hazırlanmıştır (Açıl ve ark. 2000, 2002). -70 °C dondurucudan çıkartılan osteoblast hücreleri 37 °C suda çözündürülüp hücre kültürü şişelerine (Sarstedt, Inc., Neuton, N.C., USA) kültürü yapıldıktan sonra % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 normal hava içeren, 37 °C buhara doymuş kültür kuluçka dolabına (Firma Haereus Christ, Osterode) konulmuştur. Her besin maddesi değişiminde kültür şişelerini mikroskop altında bakteri ve mantar kontaminasyonuna karşı kontrol edilmiştir.

### **3.1.3 Hücre Ekimi**

Ekimi yapılacak kültür şişeleri kuluçka dolabından çıkarılıp besin maddesi atılıp, sonra PBS (10 ml/100 cm<sup>3</sup>) ile yıkandı, PBS' i de döktükten sonra Trypsin-EDTA (% 0,05 Trypsin, PBS ile çözülmüş EDTA, 5 ml/100 cm<sup>3</sup>, Biochrom KG, Seromed, Berlin, Trypsin-EDTA Solution) eklenip kuluçka dolabında 5-10 dakika hücrelerin çözünmesi beklenmiştir. Bu süre sonunda bir pipet yardımıyla şişeler iyice yıkayıp hücreli bu çözelti ve yaklaşık aynı volümdeki besin maddesi bir tüpe konulmuştur. 1200 U/dak. 3 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı atılmıştır. Alttaki çözeltiye 1 ml besin maddesi eklenip iyice karıştırıldıktan sonra hücreler sayılıp, kültür yapılacak şişelere pasajı yapılmıştır. (Açıl ve ark. 2000).

### **3.1.4 Büyüme Faktörlerinin Ve Kemik Yedek Materyallerinin Hazırlanması**

bFGF 5 tane 10 µg/ml, 1 tanede 2 µg/ml şeklinde ambalajlarda bulunmaktadır. Önce her bFGF tüpüne 50 µl PBS konulup iyice karıştırdıktan sonra

tek bir tüpte toplanıp, sonra tekrar her tüpe 50 µl PBS koyup bütün karışımlar bir araya getirilip, üzerleri 5,2 ml'ye PBS ile tamamlanmıştır.

rhBMP-7'de 5 tane 10 µg/ml, 1 tanede 2 µg/ml şeklindeki ambalajlarda bulunmaktadır. rhBMP-7 toz halindedir, 10 µg/ml olan tüplere 1 ml, diğerine de 0,2 ml PBS ilave edilmiştir. Çizelge 3.1'de kullanılan büyüme faktörleri, Çizelge 3.2.'de 6 ml besin çözeltisi için kullanılmış büyüme faktörlerinin miktarları görülmektedir.

### Çizelge 3.1. Büyüme faktörlerine ait bilgiler

Büyüme Faktörleri	Adı
Bone Morphogenetic Protein-7	rhBMP-7 (Stryker Biotech, Hopkinton, USA)
Basic Fibroblast Growth Factor	bFGF (Scios Nova Corp., USA)

### Çizelge 3.2. Kullanacak büyüme faktörlerinin oran tablosu

1 ml besin çözeltisi için			6 ml besin çözeltisi için		
100 ng/ml rhBMP-7 veya bFGF	50 ng/ml rhBMP-7 veya bFGF	50ng/ml rhBMP-7 + 50 ng/ml bFGF	600 ng/ml rhBMP-7 veya bFGF	300 ng/ml rhBMP-7 veya bFGF	300ng/ml rhBMP-7 + 300 ng/ml bFGF

Çizelge 3.3'te ki kemik yedek materyalleri değişik büyüklükte olduğundan hepsi ortalama olarak aynı boyutlarda (0,5 x 0,5 x 1 cm) kesilip steril edilmiştir. Sonra steril edilmiş materyaller kültür kaplarına konulup 24 saat besin maddesi ile bekletilmiştir.

### Çizelge 3.3. Kemik greftlerine ait bilgiler

Kemik Yedek Materyalinin yapısı	Adı
Anorganik sıvır kemik mineralinden oluşan, protein ve organik madde içermeyen	Bio-Oss <sup>®</sup> , Geitlich Biomaterials, Switzerland (1 x 1 x 2 cm)
Özel antijenler, yağlar, mineraller ve enzimlerden oluşan porlu kolajen iskelet	Osteovit <sup>®</sup> , Braun (1 x 1 x 1 cm)
sentetik, porlu β-Trikalsiyumfosfattan oluşmuş seramik yapı	Chronos <sup>®</sup> , Synthes (5 x 5 x 10 mm)

### 3.1.5 Hücre Sayımı

Gelişim evresini tamamlamış kültür şişeleri teker teker kuluçka dolabından çıkarılıp, besin maddesi atılıp, ekimi yapılmıştır. Beş dakika 3000 devirde santrifüjden sonra 5 ml besin maddesi konulup iyice karıştırılmıştır. Thoma lamının

üzerini hafifce ıslatıp lamelle kapattıktan sonra, Thoma lamıyla lamel arasına besin maddesiyle karıştırılan hücreler 1-2 damla damlatılıp mikroskopta büyük kareler sayılmıştır. Sayılan rakam  $10^4$  le çarpılmıştır. Bu sayı 1 ml'deki hücre sayısını verir. Deneyde 1 ml'de 1000 hücre kullanılacağı için 1 ml'de  $12,2 \times 10^4$  olan hücreli çözelti sulandırılıp istenilen konsantrasyon elde edilmiştir.

### 3.1.6 Deney Düzeneginin Hazırlanması

Kültür şişelerine ekilen hücreler üredikten sonra pasaj yapıp, hücre süspansiyonundaki hücre sayısı hesaplanmıştır. 1 ml'de  $12,2 \times 10^4$  hücre olan süspansiyondan 1 ml'de 1000 hücre olacak şekilde sulandırılmıştır. 24 saat önce besin maddesi içinde bırakılan kemik yedek materyallerinin besin maddesi atılıp, Şekil 3.4.'de görüldüğü gibi 6 göze sahip hücre kültürü kaplarına (Nunc™ International, Dänemark, 1 göz  $10 \text{ cm}^3$  alana sahip) yerleştirilmiştir. Her bir kültür kabına aynı kemik yedek materyalinden her göze 1 tane gelecek şekilde bırakılıp, her göze önceden belirlenen oranlarda büyüme faktörleri ile 6 ml besin maddesi eklenip kuluçka dolabına yerleştirilmiştir. Her deneme 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 3.4. Hücre kültürü kabı

### 3.2 MTT Testi (Cell Proliferation Kit I, Roche, Germany)

Mikrotiterplatenin ilk sırasına kontrol, diğer sıralarına örnekler konacak şekilde protokol hazırlanıp, kontrol sırasının ilk 6 örnek kabına 100 µl besin maddesi eklenmiş ve ilk örnek kabına 100 µl'sinde 2000 hücre bulunan besin maddesinden 100 µl eklenmiştir. Sonra bu ilk örnek kabından 100 µl alıp 2. kaba, 2.'den 100 µl alıp 3.'ye, 3.'den 4.'ye, 4.'den 5.'ye, 5.'den 6.'ya eklenip her kaptaki hücre sayısı geometrik olarak azaltılmıştır. Kontrol sırasına büyüme faktörü eklenmemiştir. Diğer sıralara 200 µl'de 1000 tane hücre olacak şekilde hücre-besin maddesi karışımı eklenmiştir. Ne kadar büyüme faktörü ekleneceği hesaplanıp ve örnek kaplarına sırayla eklenmiştir.

Büyüme faktörünün hesaplanması,

1 ml'de 100 ng büyüme faktörü varsa, 6 ml'de 60 µl vardır.

1 ml'de 50 ng büyüme faktörü varsa, 6 ml'de 30 µl vardır.

$$\begin{array}{lcl} 6000 \mu\text{l'de} & 60 \mu\text{l'de varsa} & 6000 \mu\text{l'de } 30 \mu\text{l varsa} \\ \frac{200 \mu\text{l'de}}{X= 2 \mu\text{l}} & \frac{x \mu\text{l}}{\text{Büyüme faktörü}} \text{ vardır} & \frac{200 \mu\text{l'de}}{X= 1 \mu\text{l}} \frac{x \mu\text{l}}{\text{Büyüme faktörü}} \text{ vardır} \end{array}$$

Hücre ve büyüme faktörlerinin mikrotiterplateye eklenmesinden sonra 48 saat kuluçka dolabında bırakılan plate bu süre sonunda dolaptan çıkarılıp, her bir örnek kabına 10 µl MTT reagent eklendikten sonra tekrar 4 saat kuluçka dolabında bırakılmıştır. 4 saat sonunda 100 µl Solubilization solüsyonundan her örnek kabına ekleyip 24 saat kuluçka dolabında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda mikrotiterplate spektrofotometreye (Plattenphotometer Dynatech 5000, England) yerleştirilip 550 nm'de okunmuştur.

### **3.3 Raster elektron mikroskobu (REM)**

#### **3.3.1 Hücrelerin Tespiti ve Dehidrasyonu**

Araştırma sürelerinin (1., 2. ve 4. hafta) sonunda kültür kaplarından toplanan kemik yedek materyalleri fosfat tampon çözeltisinde (PBS, =100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,4) hazırlanan % 3,5'lik Glutalaldehitte 24 saat buzdolabında tespit edilmiştir. Sonra materyaller yükselen alkol sırasında (% 50, 60, 70, 80, 90, 100'lük Etanol) 5'er dakika bekletilmiştir.

#### **3.3.2 Kritik nokta kurutması ve Altın kaplama (Sputtern)**

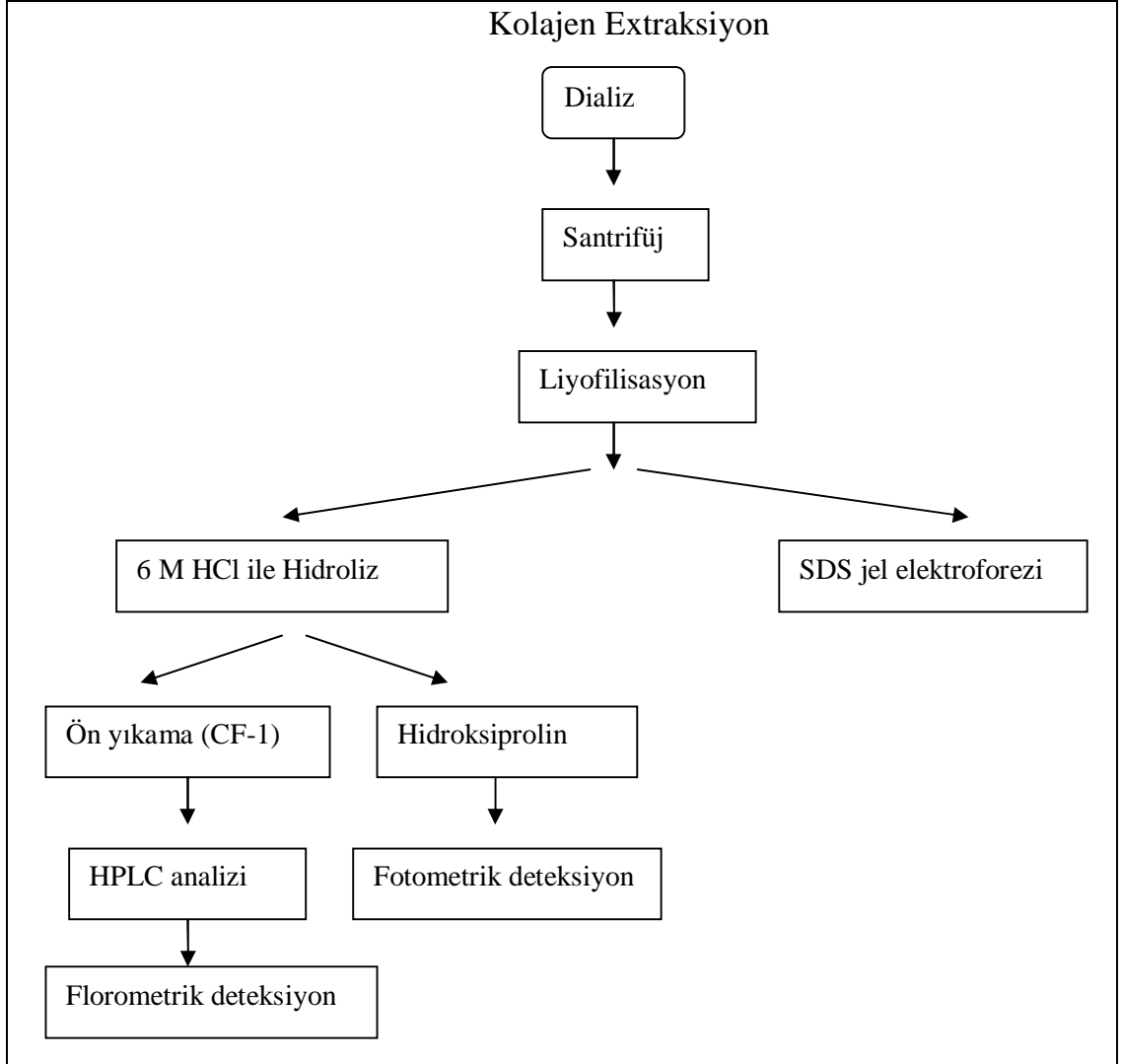
Kritik nokta kurutması yapılacak makinanın (Critical point dryer, Firma Balzer Union, Lichtenstein) bütün gaz çıkış vanaları kapatılır.  $\text{CO}_2$  vanasını açıp küvetin sıcaklığı 4 °C'ye düşürüldükten sonra gaz kapatılır, gazın dışarı çıkmasını sağlayan siyah vana yavaşça açılır. Gaz tamamen çıktıktan sonra küvete örnekleri yerleştirip siyah vanayı kapatıp  $\text{CO}_2$ 'i tekrar açılır. Küvetin içindeki sıvı oranını gösteren kırmızıçizgiye çok dikkat edilip, hep çizgide kalması sağlanır. Streepere düğmesine basıp 4 dakika bekledikten sonra küvet ısısını kontrol edip 4 °C olması sağlanır.  $\text{CO}_2$ 'i kapatılıp Healter düğmesine basılıp, küvet sıcaklığı 35 °C ve 1000 bar basınca gelince Healter düğmesi kapatılıp gazın dışarı çıkmasını sağlayan kırmızı vana yavaşça açılır. Dikkatlice küvetten dışarı çıkartılan örnekler, üzerlerine üst tarafı yapışkanlı bantlar yapıştırılan küçük metallerin üstüne yapıştırılır. Sonra örnekler hemen altınkaplama makinasının (Sputtering device, Balzer Union, Lichtenstein) vakumlama yerine yerleştirilip Argon gazının vanası açılır. Vakumlama kabındaki basınç 0,1 bar olunca 15 mA'da 1,5 dakika örnekler altınlanır. Daha sonra makina kapatılıp örnekler rasterelektronmikroskobuna yerleştirilir.

### **3.3.3 Rasterelektronmikroskopunda alıřmak**

Raster elektron mikroskopundaki analizler XL-Serie, Philips, Niederlande markalı mikroskopla yapılmıştır. Örnekler TV-Scan Modus'ta incelenecek duruma getirilip Slow-Scan Modus 1-3 ile çalışılmıştır. Spotsize 5-6 secilip 10 kV'da çalışılmıştır. 14; 31; 62; 125; 250; 500; 1000; 2000 byltmeleri yapılarak Photo-Scan Modus seçilip ve dijital fotoğraflar yapılmıştır.

### 3.4 Örneklerin Sodyumdodesilsülfat-Polyacrylamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ve HPLC İçin Hazırlanması

Çizelge 3.4. Kollajen ekstrasyon aşamalarını gösteren diagram



### 3.4.1 Proteinlerin Saflaştırılması (Kollajen Ekstraksiyon) Ve Liyofilizasyon (su çekme)

Her bir hücrede çok farklı proteinler vardır. Bir örnekten istenilen proteini saf halde elde etmek oldukça zordur. Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri, molekül büyüklüğü ve elektriksel yükleri tarafından belirlenir. Bu özelliklere görede farklı ayırma yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada diyaliz yöntemi örneklerdeki proteinleri saflaştırmak için kullanılmıştır. Bu deneyin kısa bir protokolü Çizelge 3.4

'te gösterilmiştir.

Örneklerdeki proteinlerin çevresindeki suyu uzaklaştırmak için NaCl ile, örnekleri bu tuzdan kurtarmak için ise % 0,5 Asetikasit ile muamele edilmesi gerekmektedir. Pepsin, proteinlerin 1 ve 2 zincirli heliks yapısını çabuk bozar, ama 3 zincirli kollajen, kollajenaz enzimi ile ve 37 derece sıcaklıkta muamele edilmelidir. Bu çalışmada kollajenler 25-27 °C pepsinle muamele edilmiştir. Böylece örneklerde kollajen olmayan yok edilip sadece kollajenler bırakılmıştır. Daha sonra pepsin aktivitesini durdurmak için pH 7,5'e NaOH ile ayarlanmıştır.

Toplanılan besin maddelerinin teker teker kaç ml olduğu hesaplanıp ve her birine 4,5 M NaCl koyup 24 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu arada dializ torbaları (Dialysierschlauch, MW 10000 - 12000 Da, Zellu Trans ROTH 12,05 – 45 mm ) 10 mM TRIS ve 1 mM EDTA (1,21 g TRIS + 0,40 g EDTA 1000 ml saf suda çözülür) çözeltisinde kaynatılmıştır. Kaynatıldıktan sonra 2 kez saf suyla yıkanıp kullanılacağı zamana kadar % 0,5 Asetik aside konulup buzdolabında bekletilmiştir.

4,5 M NaCl'in hesaplanması;

5,844 g NaCl	100 ml	1 M
26,29 g NaCl	100 ml	4,5 M

4,5 M' lik	100 ml çözeltide	26,29 g NaCl varsa,
	<u>X ml besin maddesinde</u>	<u>X g NaCl vardır.</u>

24 saat NaCl bekletilen örnekler 8000 devir 4 derecede 1 saat santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısmı çok dikkatlice başka tüplere alınıp dondurucuya kaldırılmıştır. 4 litre % 0,5'lik Asetik asit çözeltisi hazırlanıp magnetik karıştırıcıya konulmuştur. Önceden hazırlanan diyaliz torbalarının alt uçları bağlanıp, az miktarda % 0,5 Asetik asit çözeltisiyle karıştırılan tortular diyaliz torbalarına dökülmüştür. Eğer besin maddesi tortuyla karışmışsa asetik asit koymadan torbaya konulur. Torbaların ağızlarını bağlayıp uçlarını, içine örneklerin adları yazılan kağıtların konulduğu tüplerin ağız kısmına konulup, kapaklarıyla iyice kapatılmıştır. Günde 2 kez asetik asit solüsyonu değiştirilip, asetik asit çözeltisi beyaz olana kadar yaklaşık 3 gün karıştırıcıda bekletilmiştir. 4. gün % 0,5'lik asetik asit çözeltisinin içine 0,2 M NaCl eklenip bir günde bu çözeltiyle karıştırıcıda bekletilmiştir.

0,2 M NaCl'in hesaplanması ;

$$\begin{array}{rcl} 5,844 \text{ g NaCl} & 1000 \text{ ml} & 0,1 \text{ M} \\ \underline{X \text{ g NaCl}} & \underline{4000 \text{ ml}} & \underline{0,2 \text{ M}} \end{array}$$

X= 46,752 g NaCl 4 litrelik % 0,5'lik asetik asit çözeltisinde çözünmeli

Kollajenleri izole etmek için pepsinle kollajen haricindeki diğer proteinler parçalanmıştır. Bunun için örneklerin pH'ları 2'ye HCl ile ayarlandı ve miktarları hesaplanıp her örnekte 0,2 mg/ml Pepsin çözeltisi (Serva porcine pepsin, Boehringer Ingelheim) olacak şekilde pepsin ilave edilmiştir.

0,2 mg/ml Pepsin hesaplaması ;

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ ml'de} & & 0,2 \text{ mg pepsin varsa} \\ \underline{X \text{ ml örnek çözeltimizde}} & & \underline{X \text{ mg pepsin vardır.}} \end{array}$$

Bütün örneklere toplam kaç mg pepsin gerektiğini hesapladıktan sonra,

$$\begin{array}{rcl} 100 \text{ mg pepsin} & & 1000 \text{ µl'de varsa} \\ \underline{X \text{ mg (her bir örnek için hesaplanan pepsin)}} & & \underline{X \text{ µl'de vardır.}} \end{array}$$

diye hazırlanan toplam pepsin çözeltilisinden her bir örneğe eklenecek miktar bulunmuştur.

Pepsin ilave ettikten sonra 24 saat oda sıcaklığında karıştırıcıda bekletilen örneklerle tekrar 4,5 M NaCl ilave edilip, 1-2 saat karıştırıcıda iyice berrak olana kadar karıştırılmıştır. Sonra pepsinin çalışmasını durdurmak için pH 7,01 ile 7,5 arasında bazik bir değere NaOH ile ayarlanmıştır, 8000 devir 4 °C 1 saat santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvılar tekrar tüplere konulup dondurucuya kaldırılmıştır. Alttaki tortuları eğer sabitse % 0,5'lik asetik asit çözeltilisiyle, değilse kendi sıvısından çok az kalacak şekilde bırakıp iyice karıştırılmıştır. Elektroforez için 0,5 - 1 ml, HPLC için 2 ml ayrı tüplere konulup, ağızları parafilm ile kapatılıp, üzerlerine iğne yardımıyla birkaç delik açılmıştır. Örnekleri -70 °C'de dondurduktan sonra 1 gün liyofilizasyon (su çekme işlemi) (Fisher Scientific GmbH, Nidderau) işlemi yapılmıştır.

### **3.4.2 Sodyumdodesilsülfat- Poliacrilamid jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)**

Bir elektrik alanının etkisi altında yüklü bir partikülün göç etmesi olayına elektroforez denir. Bu elektrik alan etkisi ile yüklü partiküller net yüklerine bağlı olarak katoda veya anoda doğru göç ederler. SDS-PAGE protein saflığının kontrolü, saf protein alt yapısının incelenmesi, molekül kütlesi tayini, izoenzimlerin belirlenmesi için kullanılır. Jel elektroforezi gecikmeli redüksiyon ve denatüre edilmiş şartlarda yapılır. SDS aniyonik bir deterjandır ve proteinlerin hidrofob bölgelerine bağlanarak aminoasitlere parçalanmasını sağlarlar. Bu araştırmada SDS-PAGE ile örneklerde hücrelerin hangi tip kollajenleri ürettiği kontrol edilmiştir. Osteoblastlar Kollajen tip I ve V'e sahiptir.

Saf bir protein SDS-PAGE'de tek bir bant verir. Ancak protein alt birimlerinin farklı moleküler kütlede ve iyonda olması durumunda ise birden fazla bant görmek mümkündür. Bu çalışmanın en büyük avantajı proteinlerin molekül kütlelerinin tayinine olanak sağlamasıdır. Bu amaçla, bilinen molekül kütlelerine sahip standart proteinler, karakterize edilecek olan örneklerle aynı jel üzerine uygulanır. SDS-Poliacrilamid jel elektrophorezi Biometra (Göttingen) firmasının makinasıyla yapılmıştır.

Poliakrilamid jel, poliakrilamidin bir bağlayıcı (genellikle bis akrilamid) ile polimerize edilmesi sonucu oluşturulur. Poliakrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonları oluşacak jelin yoğunluğunu, viskotesini, elastikiyetini ve mekanik dayanıklılığını belirler. Buna bağlı olarak ta jel içinden yürüyecek moleküllerin hareketi, büyüklüklerine ve iyonlarına göre sınırlandırılmış olur. Akrilamidin bis vasıtasıyla polimerizasyonunu katalizlemek amacıyla amonyum per sülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) kullanılır. **Arajel** (Trenngel) (0,966 ml Acrylamid/Bis (Biorad), 1,980 ml 3 M TRIS, 3,050 ml safsu, 12 µl TEMED (Tetramethyethylen, Serva, Boehringer Ingelheim), 40 µl % 10 APS (1 g Ammonyumpersülfat (Serva, Boehringer Ingelheim) 10 ml saf suda 300 µl aliquotieren ile çözülür.)) Poliacrilamid jelin ¾'ünü kapsayacak şekilde önceden hazırlanan cam plakalar arasına dökülüp, üstü saf su ile tamamlanmıştır. Jelin akışkanlığı gidip katılaştıktan sonra (15-20 dakika) su dökülüp, jele zarar vermeden plakalar arasında kalan su kurutma kağıdıyla alınmıştır. **Üstjel** (Sammelgel) (360 µl Acrylamid/Bis (Biorad), 918 µl 3 M TRIS, 2,460 ml saf su, 6 µl TEMED, 40 µl % 10 APS) hazırlandıktan sonra arajelin üstüne dökülüp, 20 örneklik örnek cep tarağı yerleştirilmiştir.

Örnekleri 100 µl tampon çözelti (6,25 ml 1 M TRIS (1,21 g TRIS + 6 ml safsu % 32'lik HCl ile pH 6,8'e ayarlanır ve hacim 10 ml'ye tamamlanır, bu 1 M'lik TRIS'tir), 2,5 g SDS (Sodyumdodesilsülfat), 10 ml Gliserol, 25 ml saf su, 3,75 ml % 0,25 Bromphenolblau) eklenip, mikserde iyice karıştırıldıktan sonra 95 °C 5 dakika denatüre edilerek, (Thermostat, Eppendorf, Hamburg) 2 dakika buzda soğutulmuştur. Elektroforez kabına bir miktar elektrot tampon çözeltisi (12,1 g TRIS, 17,9 g Tricine, 1 g SDS, 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır pH 8,25'e NaOH ile ayarlanır) konulup cam plakaları yerleştirilmiştir. Kabin tam üstü örtülene kadar tampon çözeltiyle doldurulup, örnek cep tarağı yavaşça çıkarılmıştır, jel artıkları temizlenip, her bir örnek cebi şırıngayla yıkanmıştır. İlk cebe cilt, ikinciye kemik, üçüncü cebe kıkırdak hücrelerinden oluşan standartları 7 µl eklenip, ilk cebe sadece 7 µl tampon çözelti konulmuştur, sonrada örnekler örnek ceplerine 7 µl eklenmiştir. Elektroforez kabı ilk 15 dakika 50 V'ta çalıştırılıp, sonra voltaj 70 V'a çıkarılmıştır. Örneklerin yürümesi yarıya kadar geldiğinde makina durdurulup 7 µl Late Reduktion solüsyonu (20 µl

Mercaptoethanol + 180 µl tampon çözelti) eklenmiştir. 10 dakika bekledikten sonra makina tekrar açılıp bütün örneklerin aşağı inmesi beklenmiştir (1-2 saat).

- ♦ Bromfenol Mavi: İyonize olabilen bir boyadır ve elektroforezin kolay izlenebilmesi için ortama ilave edilir.
- ♦ SDS: Her bir iki aminoasit aralığına bağlanarak yük maskelenir.
- ♦ Merkaptoetanol: Proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağlarını indirger.
- ♦ Gliserol: Örnek solüsyona bir yoğunluk kazandırması ve elektroforez hücreğine uygulandığında örneğin elektroforez tamponunda kolayca çökmesini sağlar.

### 3.4.3 Elektroforezde Kullanılan Jel Boyama Teknikleri

Elektroforez işleminden sonra jelde proteinlerin belirlenmesi için organik (Coomasie Brilliant Blue R-250) veya metal tabanlı (Gümüş nitrat ile boyama (Siberfärbung)) boyalar kullanılır. Coomasie Brilliant Blue R-250 ile 1.0-0.5 mg, Gümüş nitrat boyama (Siberfärbung) ile 10 ng protein miktarına kadar olan proteinler analiz edilebilir.

#### ▼ Coomasie Brilliant Mavi R-250

Elektroforezden sonra jel, Coomassie Brilliant Mavi (1,25 g Coomassieblau, 40 ml Metanolde çözülür, 200 g Triklor asetik asit 900 ml saf suda çözülür ve bu iki çözelti karıştırılıp 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır. Bu çözelti kullanıldıktan sonra filtre edilirse 3 kez daha kullanılabilir.) ile 5 dakika karıştırıcıda bekletilip diğer kaptaki % 7'lik Asetikasit çözeltisine konulmuştur. 5., 15., 25. dakikalarda ve 1. saatte Asetikasit çözeltisi tazelenip 24 saat karıştırıcıda bekletilmiştir. Jel, saf suyla ıslatılan özel iki folyo (Gel air cellophane, Bio-rad Laboratories, Kalifornien, USA) arasına konulup, jel kurutucuda (Gel drying frame, Bio-rad Laboratories, Kalifornien, USA) kurutulmuştur. Bu şekilde uzun süre jel saklanabilir.

√ Gümüş nitrat ile boyama (Siberfärbung)

Gümüş boyama için tekrar yapılan elektroforezde 15 µl'lik örnek cep tarağı kullanılmıştır. Örnekler ceplere 15 µl eklenmiştir.

Elektroforez bittikten sonra cam plaklardan çıkartılan jeller 30 dakika karıştırıcıda tespit çözeltisiyle (1 jel için; 60 ml saf su, 30 ml % 96'lık Etanol, 10 ml Asetik asit) tespit edilip, bu çözeltiyi döküldükten sonra 30 dakikada Reduksiyon çözeltisiyle (4,8 g Sodyum asetat, 45 ml Etanol ve 80 ml saf su karıştırılır, pH 6'ya Asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg Sodyumtiyosülfat, 3 ml Glutalaldehit eklenip 150 ml'ye saf su ile tamamlanır) karıştırıcıda bekletilmiştir. Bu süre sonunda jeller 3 kere saf su ile 5'er dakika iyice yıkanmıştır. 20 dakika gümüş nitrat çözeltisiyle (150 mg Gümüş nitrat, 150 ml saf su, 30 µl Formaldehit) karıştırıcının üstünde boyanmıştır. Bu boya boyamaya başlamadan kısa bir süre önce hazırlanıp karanlıkta bekletilir. 3,75 g Sodyum karbonat, 270 ml saf su ve 120 µl Formaldehitten oluşan banyo çözeltisiyle kısa ve çabukça yıkayıp siyahlaşan sıvı dökülmüştür. Bantlar görülünce de 1 ml Gliserin ve 250 ml'lik % 5'lik Asetik asitten oluşan çözeltiyi iyice yıkanmıştır. Boyama işlemler bittikten sonra jeller bilgisayarda (Biometra, Göttingen) taranıp kurutulmuştur.

### **3.5 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC Yöntemi)**

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi, solüsyonda çözünmüş maddelerin ayrımını/analizini sağlayan bir kromatografi tekniğidir. Karışım halindeki farklı maddeler, kolon içindeki durağan faz ve taşıyıcı sıvı faz arasındaki farklı dağılımları nedeniyle ayrılırlar. Farklı hidrofobi sitelere sahip küçük moleküllerin, proteinlerin, peptidlerin vb. ayrımında kullanılır (trigliseritler, esterler, yağ asitleri, vitaminler, tatlandırıcılar, pestisitler, karbonhidratlar, amino asitler, organik ve aromatik amino asitler, analjezikler).

### 3.5.1 CF-1'in (Fibröse Cellülose) Hazırlanması

Örnekler Adsorpsiyonkromatografi (fibröse Cellülose, CF-1, Whatman, Springfield Mill Maidstone, England) için Aminoasitler, Karbonhidratlar, tuzlar ve amonyak gibi organik komponentlerden ayrıştırılmalıdır. Bunun için % 10'luk CF-1 adsorpsiyonsmateryal olarak kullanıma hazırlanmıştır.

1. 100 g CF-1 3 litre 1 M Sodyumasetat çözeltisinde çözülüp, oda sıcaklığında 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.
2. Karıştırıcıdan sonra 10 dakika selülozun dibe çökmesi beklenip, üstteki sıvı atılmıştır.
3. Alttaki tortu kurutma kağıdından süzülüp, kurumaya bırakılmıştır.
4. Kurutma kağıdındaki selüloz 3 l 0,5 M NaOH'ta çözülüp, manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırılmış ve çöktürülmüştür. Üstteki sıvı atılıp, alttaki tortu tekrar kurutma kağıdından süzülüp, kurutulmuştur. Bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır.
5. Kurutma kağıdındaki tortu tekrar 3 l saf su ile sulandırılıp, 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp üstteki sıvı atılmış, alttaki tortu tekrar kurutma kağıdından süzülüp kurumaya bırakılmıştır.
6. Sonra selüloz 3 l 0,5 M HCl'de çözülüp, 5 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Tortu çöktürülmüş, üstteki sıvı atılıp, alttaki tortu kurutulmuştur. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
7. Bu işlemlerden sonra son kurutma kağıdı 3 l 0,1 M HCl ve % 95 Etanol karışımı ile yıkanıp, 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, tortu çöktürülüp, üstteki sıvı atılmış, tortu kurutma kağıdından süzülüp kurumaya bırakılmıştır.
8. CF-1 3 l saf suyla yıkanıp, 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, tortu çöktürülüp, üstteki sıvı atılmış, tortu kurutma kağıdından süzülüp kurumaya bırakılmıştır.. Bu işlem iki kez yapılmıştır.
9. Kurutulan son kurutma kağıdı 24 saat, 3 l 0,1 M Sodyum asetat ve 3 mM EDTA'dan oluşan çözeltide bekletilmiştir.

10. Sonra CF-1 materyali 3 l saf suyla yıkanmış, 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, çöktürülmüş, üstteki sıvı atılıp, tortu kurutma kağıdından süzülüp kurumaya bırakılmıştır. Bu işlem iki kez yapılmıştır.

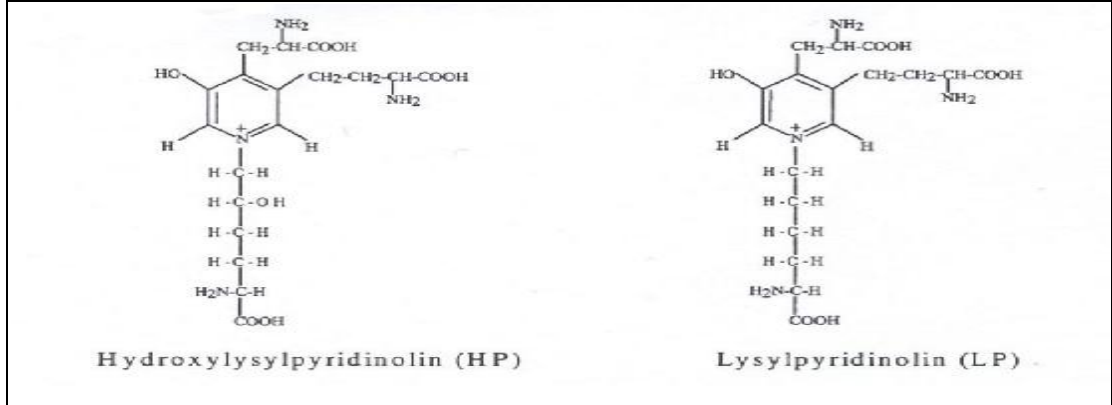
11. CF-1 materyali 10 ml Kloroformda kullanılacağı zamana kadar saklanmıştır.

### **3.5.2 HPLC-Analizi için örneklerin hazırlanması ve Hidroliz**

HPLC analizi ile kollajenlerin birleşip kemik dokusunu oluşturup oluşturmadığı araştırılır. Olgun kollajenlerin çapraz bağlantı elemanları Lisilpiridinolin (LP) ve Hidroksilisilpiridinolin (HP) Crosslinks, (Şekil 3.9.) HPLC analizi ile ispatlanabilir.

Örneklerdeki kollajenleri oluşturan HP ve LP'nin serbest kalması için 3.5.1'deki gibi suyu alınmış (lyophilisation) örneklerin üzerlerine 6 M'lik 2 ml HCl eklenip iyice karıştırıldıktan sonra, hidroliz tüplerine konulmuştur. Tüpler 24 saat 110 °C Termoblokta (Biometra, Göttingen) inkübe edilmiştir. Tüplerin kapakları ilk saatlerde sık kontrol edilip, tortulu örnekler santrifüj edilerek üstteki sıvı alınmıştır. Bu Hidrolizat`tan 50 µl Hidroksiprolin için ayrılmıştır.

HP ve LP'nin flüoresans özelliğinden dolayı örneklerdeki HP ve LP konsantrasyonu kollajen yapısının bozulmasından sonra Reverse-Phase-Pompası ve Flüoresan Dedektör vasıtasıyla kanıtlanır. Flüoresan dedektörler maddelerin belli dalga boyunda ışığı absorbe etmesi ve tekrar yansıtma özelliğini ölçer ve her maddenin flüoresan özelliği farklıdır.



**Şekil 3.5.** Crosslinks Hidroksililpiridinolin (HP) ve Lisilpiridinolin (LP)

(Broek, 2003)

### 3.5.2.1 Adsorpsiyonkromatografi

Anorganik tuzları, amonyağı, aminoasitler, karbonhidratlar gibi organik maddeleri Pyridinoline HP ve LP'den uzaklaştırmak için Adsorpsiyonkromatografide prensip olarak % 10'luk CF-1 (Whatman, Springfield Mill Madison, England) kullanılır.

- 1) 1 ml örneğe 1 ml Asetik asit, 5 ml % 10'luk CF-1 (4:1:1 oranında n-Butanol/ Asetik asit/ Saf su çözeltisinde) konulup, iyice karıştırılmıştır.
- 2) Bu karışıma 2 ml n- Butanol eklenip iyice karıştırılmış, sonra Polyprep-Kromatografi filtresinden (40 x 8 mm, 2 µm porlu filtre, Bio-Rad, D-München) süzülmüştür. Alttağı sıvı atılmadan 2 kez daha aynı filtreden tekrar süzülmüştür.
- 3) Bu işlemden sonra alttağı sıvı atılıp, filtrenin üstüne iki kez 5 ml % 10'luk CF-1 konup süzülmüştür.
- 4) Alttağı sıvı atıldıktan sonra filtreler temiz tüplerin üstüne yerleştirilip, iki kez 3 ml saf suyla yıkanmıştır. Çünkü saf su filtrenin tuttuğı kollajeni serbest bıraktırıp alttağı tüpe geçmesini sağlar. Eğer filtrede çok az miktarda sıvı kalmışsa enjektörle bu sıvı çekilip atılır sonra saf su konulur.
- 5) -70 °C'de bu karışımı dondurduktan sonra su çekirme işlemi (Liofilisasyon) yapılmıştır.

6) Sonra bu örnekler % 0,22'lik 500 µl HBFA'da (Heptafluorbuttersäure) çözülüp, Vortex karıştırıcıda 1 dakika karıştırılıp, 1 ml analiz şişelerine (Firma Gynkotheek, Germering) konulup, HPLC (High performance liquid chromatographie) (Firma Gynkotheek, Germering) makinasıyla analiz edilmiştir.

### 3.5.2.2 HPLC ile örneklerin analizi

HPLC bir ayrılma yöntemini tanımlar, bu yöntem tarafından sıvı örnekler ayrılma çubuğunda yüksek basınç altında sıvı fazda transport edilirler. Bu yöntemde Adsorptions ve dağılım kromatografisi yöntemine daha çok rastlanır.

Pyridinoline (Crosslinks) analizi oda sıcaklığında, 0.7 ml/dak. Akıntı hızıyla yapılmıştır. Flüoresans Dedektör (Fluoreszenz-Dedektor RF 1002, Gynkotek, D-Germering) 297 nm Ekstinksiyon ve 397 nm Emisyonda yürütülmüştür. Kromatografik ayrılmanın gradienti çözelti A ve B tarafından oluşturulmuştur.

Çözelti A: Saf suda % 0,22 HFBA (Heptafluoro butirik anhidrik)

Çözelti B: Asetonitril ve saf suda (80:20) % 0,22 HFBA

- 1) Başlangıçta çözelti A % 81, çözelti B % 19 oranında hazırlanmıştır.
- 2) 24 dakika içinde çözelti B'nin konsantrasyonu % 19'dan % 21'e yükselmiştir.
- 3) Ondan sonraki 5 dakika içinde çözelti B'nin konsantrasyonu % 100'e ulaşmıştır.
- 4) Kromatografi çubuğu (Bischoff chromatography, Leonberg/Germany) 5 dakikada % 100'lük çözelti B ile temizlenmiştir.
- 5) Sonra 4,2 dakikada çözelti B'nin konsantrasyonu % 19'a inmiştir.
- 6) Çözelti A ve B arasındaki oran son analizin başlangıcına kadar 81:19 olmuştur.

pMol değerindeki Crosslinks'in (HP ve LP) konsantrasyonu standartların (Osseinhydrolysat; Deutsche Gelatine-Fabriken Stoess AG, D-Eberbach) yardımıyla belirlenmiş ve ayrıca kromatografi çubuğunda ayrışmanın iyi olup olmadığının kontrolü burada kontrol edilmiştir (Açıl ve Müller 1995).

### 3.5.2.3 Hidroksiprolin Analizi

Örneklerdeki Hidroksiprolin konsantrasyonu bize toplam kollajen miktarını verir. Hidroksiprolin analizi için her Hidrolizat'tan (bakınız 3.5.2) 50 µl ayrıtılan preparatlar kullanılmıştır. Analiz Açıl ve Müller (1995)'e göre yapılmıştır.

96 hücre bulunan mikrotiterplatete Hidroksiprolinden seyreltilmiş iki standart sırası hazırlanmıştır.

1) 100; 83; 50; 41,5; 25; 20,7; 12,5; 10,3; 8,2; 5; 3,1 µg/ml.

Bu örneklerden 30 µl alınıp, 1:10 oranında seyreltilip ve mikrotiterplatenin hücrelerine yerleştirilmiştir.

2) 75; 50; 37,5; 25; 18,7; 12,5; 9,3; 6,2; 4,6 µg/ml.

Bu örnek 3 bölüm 1. maddedeki standarttan ve 1 bölüm saf sudan oluşturulmuştur. 30 µl örneklerden alınıp bu hücrelerin üzerine eklenmiştir.

Daha sonra 70 µl Propanol çözeltisi (10 ml 2-Propanol + 5 ml saf su) ve 50 µl ChloramineT (1,4 g ChloramineT + 20 ml saf su + 100 ml Tampon çözelti (34,38 g Sodyum asetat + 37,50 g Trisodyumsitrat + 5,50 g sitrik asit 400 ml saf suda çözülür, 400 ml 2-Propanol eklenir ve 1000 ml'ye saf suyla tamamlanır.)) mikrotiterplateye eklenir, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 125 µl Ehrlichs reagenz (1,2 g Dimetilaminobenzaldehit (Serva 20150) + 1,8 ml % 60'lik Perklorasit (Merck 1.00518) + 10 ml 2-Propanol) kullanılmadan kısa bir süre önce hazırlanıp her hücreye eklenmiştir. 10 dakika 70 °C'de inkübe edilip 550 nm'de spektrometrede (Plattenphotometer, Molecular Devices, England) okunmuştur.

### 3.6 ELISA

#### 3.6.1 VEGF Analizi (R&D Systems, Orlando, USA)

Analize başlamadan 15 dakika önce standardın üzerine 1 ml kalibratör eklenip iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan 7 tane plastik tüpün her birine 500 µl kalibratör konulup, hazırlanan standarttan ilk tüpe 500 µl, ilk tüpten de 500 µl alınıp 2. tüpe, 2.´den 3.´ye, bu işlemi 7. tüpe kadar yapıp, aşağıdaki çizelgede görüldüğü gibi değişik konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.5.** VEGF analizi standart konsantrasyonları

Standart	1. tüp	2. tüp	3. tüp	4. tüp	5. tüp	6. tüp	7.tüp
2000 pg/ml	1000 pg/ml	500 pg/ml	250 pg/ml	125 pg/ml	62,5 pg/ml	31,2 pg/ml	15,6 pg/ml

Mikrotiterplatenin her hücreğine 50 µl Diluent RD1W eklenmiştir. Sonra değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlardan ve örneklerden 200 µl sırayla hücrelere eklenip, oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. 20 ml yıkama tampon çözeltisi 500 ml saf su ile karıştırılıp, her hücre için 200 µl olacak şekilde 3 kez yıkama çözeltisiyle örnekler yıkanmıştır. 200 µl VEGF Conjugate çözeltisinden her hücreye ekleyip oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Sonra tekrar 3 kez yıkama çözeltisiyle yıkanmıştır. Kullanmadan 15 dakika önce hazırlanan Substrat solüsyonundan (Color Regents A ve B karıştırıldı) her hücreye 200 µl konulup karanlıkta, oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiş, bu süre sonunda hücrelere 50 µl Stop Solution eklenip 450 nm´de spektrofotometre de okunmuştur.

#### 3.6.2 BMP-2 (R&D Systems, Orlando, USA)

Analize başlamadan 15 dakika önce standardın üzerine 1 ml saf su eklenip iyice karıştırılmıştır. Ayrı bir kaptaki 20 ml kalibratör ile 200 ml saf suyu karıştırılıp, hazırladığımız 7 tane plastik tüpten 1.´sine 800 µl, diğer tüplerin her birine 500 µl

kalibratör koyup, hazırlanan standarttan ilk tüpe 200 µl, ilk tüptende 500 µl alıp 2. tüpe, 2.'den 3.'ye, bu işlem 7. tüpe kadar yapılıp, aşağıdaki çizelgede görüldüğü gibi değişik konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.6.** BMP-2 analizi standart konsantrasyonları

Standart	1. tüp	2. tüp	3. tüp	4. tüp	5. tüp	6. tüp	7.tüp
20000 pg/ml	4000 pg/ml	2000 pg/ml	1000 pg/ml	500 pg/ml	250 pg/ml	125 pg/ml	62,5 pg/ml

Mikrotiterplatenin her hücreesine 100 µl Assaydiluent RD1-19 eklenmiştir. Sonra değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlardan ve örneklerden 50 µl sırayla hücrelere eklenip, oda sıcaklığında 2 saat karıştırıcıda bekletilmiştir. 20 ml yıkama tampon çözeltisin 500 ml saf su ile karıştırıp, her hücre için 200 µl olacak şekilde 4 kez yıkama çözeltisiyle örnekler yıkanmıştır. BMP-2 Conjugate çözeltisinden her hücreye 200 µl eklenip oda sıcaklığında 2 saat karıştırıcıda bekletilmiştir. Sonra tekrar 4 kez yıkama çözeltisiyle yıkayıp, kullanmadan 15 dakika önce hazırlanan Substrat solüsyonundan (Color Regents A ve B karıştırıldı) her hücreye 200 µl konup karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş, bu süre sonunda hücrelere 50 µl Stop Solution eklenip 450 nm'de spektrofotometrede okunmuştur.

### 3.6.3 BMP-4 (R&D Systems, Orlando, USA)

Analize başlamadan 15 dakika önce standardın üzerine 1 ml saf su eklenip iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan 7 tane plastik tüpten 1.'sine 900 µl, diğer tüplerin her birine 500 µl kalibratör konulup, hazırlanan standarttan ilk tüpe 100 µl, ilk tüpten de 500 µl alınıp 2. tüpe, 2.'den 3.'ye, bu işlem 7. tüpe kadar yapılıp, Çizelge 3.8.'de görüldüğü gibi değişik konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.7.** BMP-4 analizi standart konsantrasyonları

Standart	1. tüp	2. tüp	3. tüp	4. tüp	5. tüp	6. tüp	7.tüp
20000 pg/ml	2000 pg/ml	1000 pg/ml	500 pg/ml	250 pg/ml	125 pg/ml	62,5 pg/ml	31,2 pg/ml

Mikrotiterplatenin her hücresine 100 µl Assaydiluent RD1-61 eklenmiştir. Sonra değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlardan ve örneklerden 50 µl sırayla hücrelere eklenip, oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. 20 ml yıkama tampon çözeltisi 500 ml saf su ile karıştırılıp, her hücre için 200 µl olacak şekilde 4 kez yıkama çözeltisiyle örnekler yıkanmıştır. 200 µl BMP-4 Conjugate çözeltisinden her hücreye eklenip oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta bekletilip, tekrar 4 kez yıkama çözeltisiyle yıkanmıştır. Kullanmadan 15 dakika önce hazırlanan Substrat solüsyonundan (Color Regents A ve B karıştırıldı) her hücreye 200 µl konup karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve bu süre sonunda hücrelere 50 µl Stop Solution eklenip 450 nm'de spektrofotometre de okunmuştur.

## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

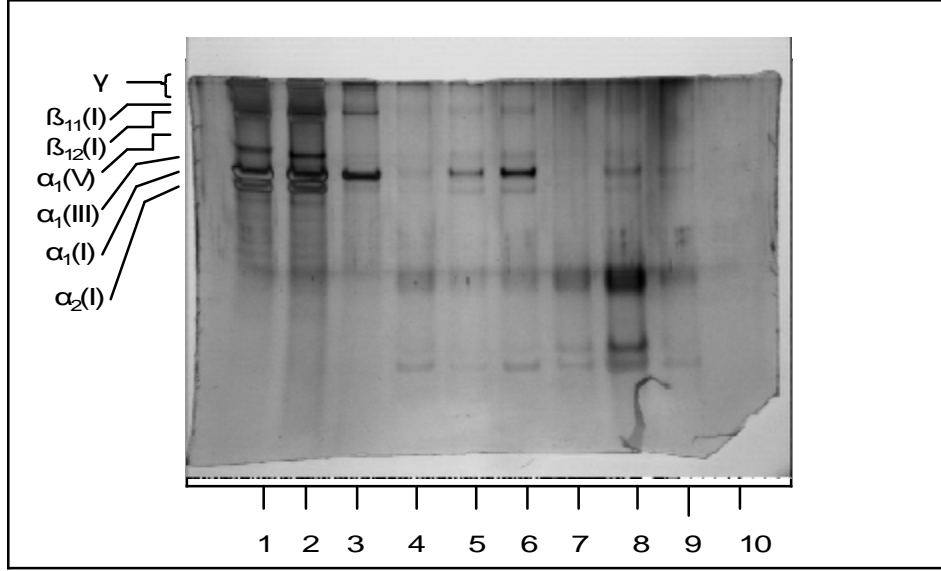
### 4.1. SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforezden elde edilen resimlerde kollajen tip I, III ve V'in  $\alpha$  halkaları görülür.  $\alpha 2(I)$  halkaları  $\alpha 1(I)$  halkaları ile aynı moleküler ağırlığa (95,000 Dalton) sahip olmalarına karşın daha büyük elektroforetik hareketliliğe sahiptir. Kollajen tip III'ün teşhisi için yavaşlatıcı redüksiyon uygulanmıştır. Bu sebepten kollajen tip III'ün  $\alpha$  halkaları  $\alpha 1(I)$  halkaları olarak reaksiyonda yavaş yürütülmüştür (Moleküler ağırlığı 140,000 – 160,000 Da). Kollajen tip V'in  $\alpha$  halkaları yaklaşık 125,000 Da moleküler ağırlığa sahiptirler.

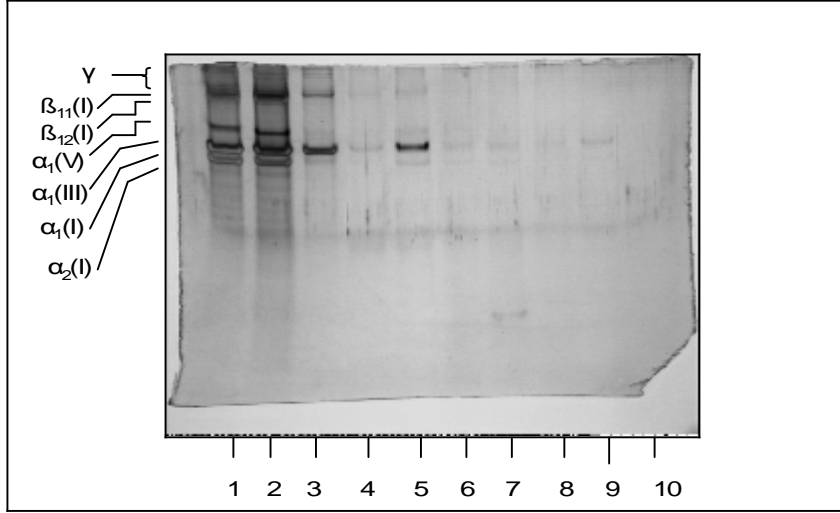
Besin maddelerinden elde edilen örneklerdeki kollajenler Osteovit®'te ve Chronos®'ta kemik standartı ile aynı elektroforetik tepkiyi vermiştir. Bio-Oss®'un rhBMP-7 50 ng/ml - bFGF 50 ng/ml ve kontrol grubunda az miktarda, diğer gruplarında ise kemik standartı ile aynı tepki gözlemlenmiştir. Osteovit®'te en fazla bFGF 100 ng/ml, sonrada rhBMP-7 50 ng/ml verilen kültürde kontrole göre daha fazla kollajen tip I ve V'e rastlanmıştır. Bio-Oss®'ta rhBMP-7 50 ng/ml'de kontrole göre fazla kollajen tip I ve V'e rastlandı. Chronos®'ta ise kontrole göre rhBMP-7 100 ng/ml'de, rhBMP-7 50 ng/ml'de ve bFGF 50 ng/ml'de fazla miktarda kollajen tip I ve V'e rastlanmıştır.

Materyaller arasında bir karşılaştırma yaparsak; 100 ng/ml rhBMP-7 verilmiş Bio-Oss® ve Osteovit®'te aynı, Chronos®'ta ise onlara göre çok az kollajen tip I ve V'e rastlanmıştır. 50 ng/ml rhBMP-7 verilmiş Chronos® ve Osteovit®'te aynı, Bio-Oss®'ta az, 100 ng/ml bFGF'de Bio-Oss® ve Chronos®'ta aynı, Osteovit®'te az, 50 ng/ml bFGF verilmiş Bio-Oss® ve Osteovit®'te aynı, Chronos®'ta çok az, 50 ng/ml rhBMP-7 + 50 ng/ml bFGF verilmiş kültürde ise en fazla Osteovit®'te, sonra Bio-Oss®'ta, en az olarak Chronos®'ta kollajen tip I ve V'e rastlanmıştır. Kontrol gruplarında kullanılan bütün materyallerde aynı oranda kollajen gözlemlenmiştir. Şekil 4.6. Osteovit®, Şekil 4.7. Bio-Oss®, Şekil 4.8. ise Chronos®'tan toplanan besin maddelerinin kollajen ekstraksiyonundan sonra uygulanan SDS-PAGE'de değişik

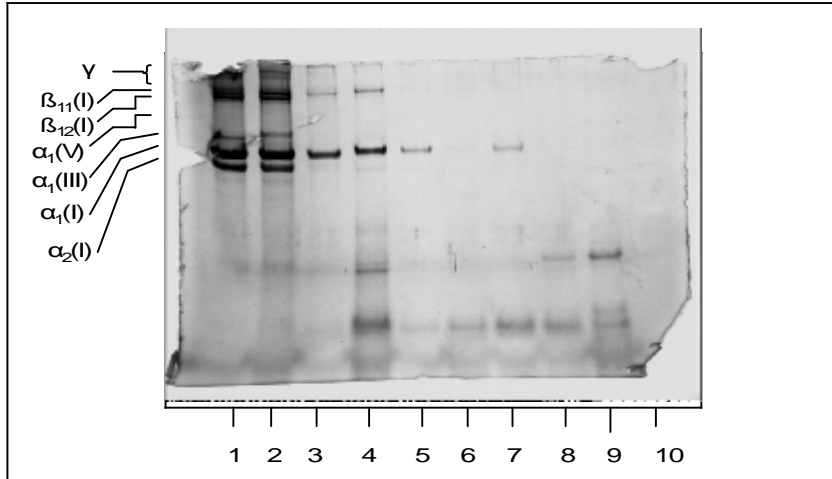
kollajen tiplerinin  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -Komponentlerini göstermektedir.



**Şekil 4.6. Osteovit<sup>®</sup>** 1= Kemik standartında  $\alpha$ -,  $\beta$ 12-,  $\beta$ 11- und  $\gamma$ -Komponentleri; 2= Cilt standartı ; 3= Kıkırdakdoku standartı; 4= 100 ng/ml rhBMP-7 verilen besinmaddesi; 5= 50 ng/ml rhBMP-7 verilen besinmaddesi; 6= 100 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 7= 50 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 8= 50 ng/ml rhBMP-7 ve 50 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 9= büyüme faktörü verilmemiş besinmaddesi, 10= boş



**Şekil 4.7. Bio-Oss®** 1= Kemik standartında  $\alpha$ -,  $\beta_{12}$ -,  $\beta_{11}$ - und  $\gamma$ -Komponentleri; 2= Cilt standartı ; 3= Kıkırdakdoku standartı; 4= 100 ng/ml rhBMP-7 verilen besinmaddesi; 5= 50 ng/ml rhBMP-7 verilen besinmaddesi; 6= 100 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 7= 50 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 8= 50 ng/ml rhBMP-7 ve 50 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 9= büyüme faktörü verilmemiş besinmaddesi, 10= boş



**Şekil 4.8. chronoss®** 1= Cilt standartında  $\alpha$ -,  $\beta_{12}$ -,  $\beta_{11}$ - und  $\gamma$ -Komponentleri; 2= Kemik standartı ; 3= Kıkırdakdoku standartı; 4= 100 ng/ml rhBMP-7 verilen besinmaddesi; 5= 50 ng/ml rhBMP-7 verilen besinmaddesi; 6= 100 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 7= 50 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 8= 50 ng/ml rhBMP-7 ve 50 ng/ml bFGF verilen besinmaddesi; 9= büyüme faktörü verilmemiş besinmaddesi, 10= boş

## 4.2 MTT

MTT testi kabına 1000 hücre ekilip, büyüme faktörleri deneyde kullanılacak konsantrasyonlarda eklenip, 48 saat sonra sonuçları spektrofotometrede okunmuştur. Bu deneyde hücrelerin yaşayıp yaşamadığı ve hangi büyüme faktörü konsantrasyonunda iyi bir gelişme gösterdiği kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en iyi hücre çoğalmasına kontrole göre % 3,47 farkla 50 ng/ml rhBMP-7 ve 50 ng/ml bFGF verilen hücre kültürlerinde rastlanmıştır. Kontrole göre yapılan değerlendirmede diğer kültürlerde az hücre çoğalmasına rastlanmıştır. Kontrole göre ikinci rhBMP-7 100 ng/ml, üçüncü bFGF 50 ng/ml, dördüncü rhBMP-7 50 ng/ml ve en az üreme bFGF 100 ng/ml verilen kültürde görülmüştür.

## 4.3. Elisa Sonuçları

Çizelge 4.8, 1. haftada kontrollere göre en yüksek BMP-2 üreten Bio-Oss<sup>®</sup> ve Chronos<sup>®</sup> kullanılan kültürlerde rhBMP-7 50 ng/ml- bFGF 50 ng/ml, Osteovit<sup>®</sup>’te ise bFGF 100 ng/ml olduğu görülmüştür. 2. haftada Bio-Oss<sup>®</sup>’ta rhBMP-7 50 ng/ml, Chronos<sup>®</sup>’ta bFGF 100 ng/ml, Osteovit<sup>®</sup>’te rhBMP 50 ng/ml- bFGF 50 ng/ml olduğu görülmüştür. 3. haftada Bio-Oss<sup>®</sup>’ta rhBMP-7 100 ng/ml, Chronos<sup>®</sup> ve Osteovit<sup>®</sup>’te rhBMP-7 50 ng/ml olduğu görülmüştür. 4. haftada ise Bio-Oss<sup>®</sup>’ta bFGF 50 ng/ml, Chronos<sup>®</sup>’ta rhBMP-7 50 ng/ml, Osteovit<sup>®</sup>’te rhBMP-7 100 ng/ml’de diğer büyüme faktörlerine göre en yüksek BMP-2 üretimi gözlemlenmiştir.

**Çizelge 4.8.** 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrollere göre en yüksek BMP-2 üreten değişik kemik yedek materyallerinin kültürleri

BMP-2	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta
Bio-Oss <sup>®</sup>	rhBMP 50 ng/ml + bFGF 50 ng/ml %195	rhBMP 50 ng/ml %135	rhBMP100 ng/ml %111	bFGF 50 ng/ml %133
Osteovit <sup>®</sup>	bFGF 100 ng/ml %98	rhBMP 50 ng/ml + bFGF 50 ng/ml %89	rhBMP 50 ng/ml %116	rhBMP 50 ng/ml %106
Chronos <sup>®</sup>	rhBMP 50 ng/ml +bFGF 50 ng/ml % 111	bFGF 100 ng/ml %101	rhBMP 50 ng/ml %138	rhBMP 100 ng/ml %108

Çizelge 4.9.'de 1. haftada kontrollere göre en yüksek BMP-4 üreten Bio-Oss® kullanılan kültürlerde bFGF 100 ng/ml, Chronos®'ta rhBMP-7 50 ng/ml, Osteovit®'te ise rhBMP-7 100 ng/ml'de olduğu gözlemlenmiştir. 2. haftada Bio-Oss® 'ta rhBMP-7 100 ng/ml, Chronos®'ta bFGF 50 ng/ml, Osteovit®'te rhBMP-7 50 ng/ml + bFGF 50 ng/ml'de, 3. haftada da Bio-Oss® 'ta rhBMP-7 100 ng/ml, Chronos® ve Osteovit®'te rhBMP-7 50 ng/ml'de, 4. haftada ise Bio-Oss® 'ta rhBMP-7 50 ng/ml + bFGF 50 ng/ml, Chronos®'ta rhBMP-7 50 ng/ml, Osteovit®'te rhBMP-7 50 ng/ml +bFGF 50 ng/ml'de diğer büyüme faktörlerine göre en yüksek BMP-4 üretimi gözlemlenmiştir.

**Çizelge 4.9.** 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrollere göre en yüksek BMP-4 üreten değişik kemik yedek materyallerinin kültürleri

BMP-4	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta
Bio-Oss®	bFGF100 ng/ml % 791	rhBMP 100 ng/ml % 347	rhBMP 100 ng/ml % 105	rhBMP 50 ng/ml + bFGF50 ng/ml % 135
Chronos®	rhBMP 50 ng/ml % 72	bFGF 50 ng/ml % 316	rhBMP 50 ng/ml % 176	rhBMP 50 ng/ml % 95
Osteovit®	rhBMP100 ng/ml % 99	rhBMP50 ng/ml + bFGF50 ng/ml % 150	rhBMP 50 ng/ml % 73	rhBMP 50 ng/ml + bFGF50 ng/ml % 70

Çizelge 4.10.'de elde edilen ELISA sonuçlarına bakıldığında 1. haftada ve 2. haftada Bio-Oss® kullanılan, 2. haftada Osteovit® ve 4. hafta Chronos® kullanılan hücre kültürlerinin bütün büyüme faktörlerinde % 100 kabul edilen kontrolle göre daha düşük VEGF üretimi gözlemlenmiştir. Genel olarak en iyi VEGF üretimini Osteovit® 4. haftadan elde edilen örnekte gözlemlenmiştir. Sonuçlara baktığımızda kontrolle göre büyüme faktörleri arasından en iyi VEGF üretimine 1. ve 2. haftalarda Chronos® materyali, 50ng/ml rhBMP-7 verilen hücre kültüründe, 3. haftada Osteovit®' li 50 ng/ml bFGF verilen ve 4. haftada ise Osteovit®' li 100 ng/ml bFGF verilen kültürlerde rastlanmıştır.

**Çizelge 4.10.** 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrollere göre en yüksek VEGF üreten değişik kemikyedekmateryallerinin kültürleri

VEGF	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta
Bio-Oss®	bFGF 100 ng/ml % 86	bFGF 50 ng/ml % 89	bFGF 50 ng/ml % 110	rhBMP-7 50 ng/ml % 111
Osteovit®	rhBMP-7 50 ng/ml % 123	bFGF 100 ng/ml % 99	bFGF50 ng/ml % 112	bFGF 100 ng/ml % 145
chronos®	rhBMP-7 50 ng/ml % 136	rhBMP-7 50 ng/ml % 101	bFGF50 ng/ml % 104	rhBMP-7 50 ng/ml + bFGF50 ng/ml % 93

#### 4.4 Farklı Kemikyedekmateryallerinde, Değişik Konsantrasyonlarda rh BMP ve FGF Büyüme Faktörleri Uygulanan Hücrelerin Raster Elektron Mikroskopundan Elde Edilen Sonuçları

**Çizelge 4.11.** Aynı kemikyedekmateryalinde, aynı zaman aralığında, değişik konsantrasyonlarda hücrelere verilen büyüme faktörlerinin gelişim sıralamaları

	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta
Bio-Oss®	bFGF 50 ng/ml	rhBMP-7 50 ng/ml	rhBMP-7 100 ng/ml
chronos®	rhBMP-7 50 ng/ml	rhBMP-7 50 ng/ml	bFGF 50 ng/ml
Osteovit®	rhBMP-7 50 ng/ml	bFGF 100 ng/ml	bFGF 50 ng/ml

Aynı kemik yedek materyalinde, aynı zaman aralığında, değişik konsantrasyonlarda hücrelere verilen büyüme faktörlerinin gelişim sıralamaları Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Bu sıralamaya göre 1. haftada Bio-Oss® bulunan kültürlerde bFGF 50 ng/ml verilen örnekte en iyi gelişim gözlemlenmiştir. Chronos® ve Osteovit® kullanılan kültürlerde ise en iyi gelişim rhBMP-7 50 ng/ml’de gözlemlenmiştir. 2. haftada Bio-Oss® ve Chronos® kullanılan kültürlerde rhBMP-7 50 ng/ml’de, Osteovit®’te ise bFGF 100 ng/ml’de en iyi gelişim gözlemlenmiştir. 4. haftada Bio-Oss® kültürlerinde rhBMP-7 50 ng/ml verilen, Chronos® ve Osteovit® kullanılan kültürlerde ise bFGF 50 ng/ml verilen örnekte en iyi gelişim gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.12.’ye genel olarak bakıldığında 1. haftada değişik konsantrasyonlardaki büyüme faktörleri ile kullanılan üç kemik yedek materyali arasında en iyi hücre çoğalması Bio-Oss® kullanılan kültürlerde, Chronos® ve

Osteovit®'te ise aynı seviyede bir gelişim gözlemlenmiştir. 2. haftada yine Bio-Oss® en iyi, sonra Chronos®, daha sonrada Osteovit®'te gelişmeler gözlemlenmiştir. 4.haftada ise en iyi hücre gelişimi Bio-Oss® kültürlerinde, sonra Osteovit® kültürlerinde, sonrada Chronos® kültürlerinde izlenmiştir.

**Çizelge 4.12.** Farklı kemikyedekmateryallerinde değişik konsantrasyonlarda hücelere verilen büyüme faktörlerinin aynı zaman aralığındaki gelişim sıralamaları; 1:en iyi, 2: orta derecede gelişme gösteren, 3:diğerlerine göre en az gelişme gösteren materyal

BMP2	1.Hafta	2. Hafta	4. Hafta
BioOss® BMP 100 ng/ml	2	1	1
BioOss® BMP 50 ng/ml	2	1	3
BioOss® FGF 100 ng/ml	1	1	1
BioOss® FGF 50 ng/ml	1	1	3
BioOss® BMP 50 ng/ml + FGF 50 ng/ml	1	1	1
BioOss® Kontrol	1	1	3
Osteovit® BMP 100 ng/ml	3	2	2
Osteovit® BMP 50 ng/ml	1	3	1
Osteovit® FGF 100 ng/ml	2	2	2
Osteovit® FGF 50 ng/ml	2	3	2
Osteovit® BMP 50 ng/ml + FGF 50 ng/ml	3	3	2
Osteovit® Kontrol	3	3	1
Chronos® BMP 100 ng/ml	1	3	3
Chronos® BMP 50 ng/ml	3	2	2
Chronos® FGF 100 ng/ml	3	3	3
Chronos® FGF 50 ng/ml	3	2	1
Chronos® BMP 50 ng/ml+ FGF 50 ng/ml	2	2	3
Chronos® Kontrol	2	2	2

#### 4.5 HPLC Analizi Sonuçları (hücrelerin farklılaşma durumu)

Kemik kollajen Tip I için özel olan bağlar Hidroksilisilpirdinolin (HP) ve Lisilpirdinolin (LP) miktarları düzenli olarak topladığımız besin maddelerinde HPLC analizi yardımıyla kanıtlanmıştır. Toplam örnekteki HP ve LP konsantrasyonları yüzde olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kromatogramlarda x ekseninde mV' nin büyüklüğüne bakıldığında HP ve LP'nin karakteristik eğrileri

görünür farklılıklar oluşturur. Eğrilerin alanları, eklenen maddelerin miktarıyla eşittir, bu ölçümle ne kadar bileşen var diye hesaplanabilir. Hücre kültürlerinin kutuplanmış besin maddelerindeki HP ve LP içeriği belirli bir zaman aralığında yükselir.

REM'deki fotoğraflar, elektroforez ve HPLC'de örneklerdeki protein konsantrasyonlarının sonuçları karşılaştırıldığında elde edilen verilerin birbirini desteklediği gözlemlenmiştir. Buna göre kontrole göre en yüksek HP konsantrasyonunun Bio-Oss®'ta 50 ng/ml rhBMP-7 verilen hücre kültüründe, Osteovit®'te 100 ng/ml bFGF verilende, Chronos®'ta ise 100 ng/ml rhBMP-7 verilen kültürde olduğu görülmüştür. LP konsantrasyonuna ise kontrole göre Bio-Oss®'ta 100 ng/ml bFGF verilen kültürde, Osteovit®'te farkla 50 ng/ml bFGF verilende, Chronos®'ta ise 50 ng/ml rhBMP-7 + 50 ng/ml bFGF verilen kültürde en yüksek oranda rastlanmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemik yedek materyali doku mühendisliği sınırlarında taşıyıcı veya enjekte edilecek materyal için bir konak olarak kullanılmaktadır ve bu materyal, biolojik olarak oluşmuş biomateryallerden doğal veya sentetik nesiller meydana getirir. Bu üç boyutlu hücre taşıyıcısı sonunda adım adım azalır, ve sonra tek doku jenerasyonundan elde edilen doku kalır (Howell ve ark. 1997). Biomateriyallerin seçimi hücre kültürüne göre yapılır. Bu hücre kültürleri klinikte kullanılan özellikte olmalıdır (Açıl ve ark. 2000). Hücre kültürlerinde iki boyutlu taşıyıcı materyal kullanıldığında, doğal olmayan büyümeden dolayı pasajda veya besimaddesi değişiminde hücre kaybına rastlanır. Bu sebepten dolayı doku mühendisliğinde hücreler vücut ekstraselüler matriksini örnek olarak görmesi için üçboyutlu iskelet üzerine yerleştirilmeye başlanmıştır (Howell ve ark. 1997). Invitro ortamda kültüre edilmiş hücrelerin invivo ortamdaki hücrelerden farkı unutulmamalıdır. Bu çalışmada kullanılmış olan hücre kültürü immunolojik ve histolojik metodlarla *in vivo*' da osteoblastlara benzer olarak derecelendirilmiştir. Ondan dolayı, hücre kültüründen elde edilmiş ekstraselüler matrikste, *in vivo*' dakine benzer fibrilleşme ve değişim oluşur. Bu çalışmanın amacı rhBMP-7 ve bFGF ile stimüle edilen insan osteoblast hücrelerinin üç çeşit kemik yedek materyali (Bio-Oss<sup>®</sup>, Chronos<sup>®</sup>, Osteovit<sup>®</sup>) ile inkübe edilerek hücre yoğunluğunu ve kollajen sentezini nasıl etkilediğinin araştırılmasıdır.

Bio-Oss<sup>®</sup>, osteokondüktif etkiye sahip, steril, sığırdan elde edilen doğal kemik mineralidir. Doğal yapısı bakımından mineralize edilmiş insan kemik yapısına benzer. Bio-Oss<sup>®</sup>'un anorganik kemik matriksi, insan matriksi gibi makro ve mikro porlara sahiptir. Bu yapısal özelliklerinden dolayı yeni kemiğin implantasyon bölgesinde daha iyi gelişmesini sağlar. Zaman geçtikçe osteoklastlar ve osteoblastlar Bio-Oss<sup>®</sup>'un yerini alırlar. Bio-Oss<sup>®</sup> gibi kemikten oluşmuş kemik yedek materyallerinin iyileşmesi, rezorpsiyon ve osteokondüksiyon ile olurken, bu materyallerde, osteoindüksiyon görülmemektedir. Sentetik materyallerinde osteoindüktif özelliği bulunmamaktadır (Gazdağ ve Lane, 1995).

Kalsiyum fosfat seramiğin en bilinen bileşiği trikalsiyum fosfattır (TKF). TKF implantlar, TKF toz şeklinin naftalin gibi bir taşıyıcı ile sıkıştırılmasıyla üretilir. Daha sonra taşıyıcı olarak kullanılan naftalin ortamdan uzaklaştırılır ve poroz yapı ortaya çıkar (Jarcho, 1981). Chronos<sup>®</sup>, sentetik, porlu, biomateryallerle kullanılabilen, β- Trikalsiyumfosfat [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] seramikten oluşmuştur. Gözenekli seramikler *in vivo* olarak biyorezorbisyon göstermediklerinden kalıcı kemik implantları olarak değerlendirilirler. Kalsiyum fosfat biomateryalleri direk olarak kemik üzerine fikse edildiğinde kemik ile implant arasında fibröz dokunun oluşmadığı materyallerdir. Bu materyallerin osteogenezisi stimüle edebileceğinin düşünülmüş olmasına rağmen, bu konuda yapılan araştırmalar bu materyallerin kemik oluşumunu indüklediğini, ancak sert doku gelişimine uygun olduklarını göstermektedir (Fonseca ve Walker, 1991). Startym ve Foitzik, 1998 yılında kullanıma sunulmuş olan saf-faz β-TCP seramiğinin (β-Tricalcium Phosphate Ceramic) otolog kansellöz kemik ile kullanımında histolojik ve radyolojik bulguları incelemişler ve β- TCP seramiğinin belirtildiği gibi biyouyumlu, osteokondüktif, tamamen rezorbe olabilen bir materyal olarak implant cerrahisinde kullanımının başarılı sonuçlar vereceğini bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalarda β-TCP'nin orta derecede iyi olarak kabul edilmiştir. BMP-2 ile β-TCP kullanımında hücrelerde iyi bir gelişim gözlenmiştir. Ama β-TCP'de BMP'siz denemelerde rejenerasyon olmamıştır, implantatın bağdoku kapsülleri oluşmuştur (Kübler ve Würzler, 1998).

Osteovit<sup>®</sup>, porlu, mineral, yağ, antijen ve enzimlerden ve kemik kollajen iskeletten oluşmuş bir materyaldir. Deproteinize edilmiş kemikminerali ve kemik materyallerinin osteoblastlar ile iyi bir şekilde adepte olduğu gözlemlenmiştir (Howell ve ark. 1997). Kemik defektlerinin iyileşmesinde yumuşak ve sert dokular birbirleriyle yarışır. Defekteki hızlı gelişen yumuşak dokunun hücreleri defeki doldurur ve istenilen özellikteki kemik iskeletinin oluşumunu önlerler. Osteovit<sup>®</sup> kullanıldığında osteoblastlar tarafından yumuşak dokunun gelişimi sınırlandırılır. Osteovit<sup>®</sup>'in poröz yapısı basamaklı kemik yapısını oluşturur. Osteovit<sup>®</sup>'in kollajen matriksinin vücut dokularıyla yer değiştirmesi defekt yerine yerleştirilen miktarına bağlıdır. Kollajen az da olsa kemik hacmini destekler, ama kemik oluşumunu daha yükseltir. Bio-Oss<sup>®</sup> ve Osteovit<sup>®</sup> kemik hacmini artırma açısından elverişlidir.

Kollajen haftalar üzerine azalır, ona karşı Bio-Oss® aylarca ve yıllarca kollajen ortama verebilir. Kollajen matriks Osteovit® kendi başına osteoinduktif değildir. Prensipste osteoinduktif proteinleri taşıyıcı materyal olarak kullanılabilir.

BMP kollajenin matriks odalarında yeni kemik oluşturur. Aynı zamanda Osteovit®'in lameller yapısı osteoinduktif proteinlerle beraber kollajen resorpsiyonunun yavaşlamasını etkiler. *In vivo*' da bir süre sonra yeni oluşan kemik dokusu ve materyalin aynı olduğu görülür. Defektin büyüklüğüne göre değişmekle birlikte, maksimum 1.5 yıl içerisinde materyal tamamen rezorbe olmakta ve yerini normal kemik dokusuna bırakmaktadır (Howell ve ark. 1997). BMP'in yanında FGF gibi büyüme faktörleri daha hızlı iyileşme ve değişim için ortama enjekte edilmelidir. Göz önünde tutulmalıdır ki, bu büyüme faktörleri morfojenik değil, mitojeniktir, ki bunlar doku tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak hücre çoğalmasını harekete geçirirler. Bir deneysel çalışmada farelerin alt çene kemiğinde PRP ve rhBMP-7 ile birlikte taşıyıcı materyal olarak Bio-Oss® ve otojen kemik kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında Bio-Oss® veya otojen kemikte olsun BMP-7 ile muamele edilen kültürlerde PRP'ye göre daha iyi bir hücre çoğalması gözlemlenmiştir. rhBMP-7 araştırmalarında osteoblast hücre kültürlerinde materyallerdeki hücrelerin matriks sentezini ve hücre yoğunluğunu yükselttiği belirtilmiştir (Broek, 2003). bFGF büyüme faktörü olarak endotel hücrelerde ki mitojenik ve kimyasal aktivitesi *in vitro*' da çok güçlüdür (Sugimori ve ark., 2001). Fare femurunda bFGF' in anjiogenezi tetiklediği gözlemlenmiştir (Ren ve ark. 1997).

Önceki çalışmalar ışığında 1., 2. ve 4. haftalarda kültürü yapılmış insan osteoblast hücrelerinin olgunlaşmış kemiğe özel Kollajen I (III) sentezleme oranları SDS-PAGE elektroforezinde ve kollajen çapraz bağlantı elemanları HP ve LP'in oranları HPLC'de karşılaştırılmıştır. Sonuçta, Bio-Oss®'da ilk iki haftada diğer iki materyale oranla sonuçların yüksek olduğu, Osteovit®'te ise 4. hafta sonunda iyi bir gelişim gözlemlenmiş olup, Chronos®'ta bütün haftalarda hemen hemen aynı seviyede bir gelişim gözlemlenmiştir. Aynı materyallerde farklı oranlarda büyüme faktörleri verilen kültürlerden elde edilmiş sonuçlarda Bio-Oss®'da 1. haftada 50 ng/ml bFGF, 2. ve 4. haftalarda ise 50 ng/ml rhBMP-7 verilen kültürde en yüksek oranda yeni kemik oluşumuna rastlanmıştır. Osteovit®'te 1. haftada 50 ng/ml

rhBMP-7, 2. haftada 100 ng/ml bFGF, 4. haftada 50 ng/ml bFGF verilen kültürde, Chronos<sup>®</sup>'ta 1. ve 2. haftalarda 50 ng/ml rhBMP-7, 4. haftada ise 50 ng/ml bFGF'de kemik oluşumu diğer konsantrasyonlara göre daha fazla bulunmuştur. Bio-Oss<sup>®</sup>'ta ilk günden yeni kemik oluşumu başlamış, Osteovit<sup>®</sup>'te osteoblastlar birden değil zaman içinde yavaş yavaş gelişme göstermişlerdir. Chronos<sup>®</sup>'ta ise deneme süresince aynı oranlarda ve diğer gruplara oranla daha yavaş yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir.

*In vivo*'da BMP çok yüksek dozda kullanılsa bile istenmeyen etkiler olabileceğinden az oranda kullanılır. Çünkü BMP'nin yarılanma ömrü kan içinde çok kısadır (Roldan ve ark., 2004). Sandhu ve ark. köpek modelinde yaptığı rhBMP-2 çalışmalarında önemli faktörün BMP'nin dozu olduğunu bildirmişlerdir (Sandhu ve ark., 1996).

Dört haftalık araştırma süresinden sonra yapılan REM kontrolleri ile materyallerde osteoblast hücrelerinin oluşturduğu ekstraselüler matriksi, hücre yoğunluğunu, hücrelerin materyal üzerinde yapışması ve porların içine nasıl yerleştiği gözlemlenmiştir. REM'de tek hücreler materyal içindeki porlar ve aralıkları köprüler oluşturarak veya tamamen doldurarak kapatmışlardır. REM sonuçları elektroforez ve HPLC sonuçlarını desteklemektedir.

Anjiojenezis damarların oluşmasından önceki evrede endotel hücrelerinin kümelenmesi ile oluşan kapillerlerin dallanması ve genişlemesi ve küçük damarların büyüüp filizlenmesidir. Kısaca anjiojenezis, yeni damar gelişimi olarak tanımlanmaktadır (Fayette ve ark., 2005). Anjiojenik faktörler; tümör hücrelerinden, ortamdaki fibroblast ve monosit gibi hücrelerden ve kollojen matriksin yıkılması sonucu ortaya çıkarlar. Anjiojenezisi uyaran en önemli sitokinler; VEGF ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'dür (Fayette ve ark., 2005). VEGF kemik oluşumunda anjiojenik protein olarak merkezi bir rol oynar. Çünkü yeni kemik yapısı için kandamarı ve beslenme yollarının oluşumunda çok önemlidir. BMP'ler kırık iyileşmesinde önemli rol oynar. Enkondral kırık iyileşmesinin erken evrelerinde sadece birkaç ilkel hücre pozitif boyanırken, kemik yapımı başladığında, özellikle ilkel mezenkimal hücrelerde BMP-2 ve BMP-4'ün miktarı anlamlı oranda

çoğalmıştır (Fayette ve ark., 2005). Osteoklastlar da anjiyogenik faktörler açısından oldukça zengindirler (Moehler, ve Ho, 2003)

Yukarıda belirtilen bilgiler ile ELISA sonuçları incelendiğinde ortalama olarak BMP-2 üretimi kontrollere göre Bio-Oss®'ta 50 ng/ml rhBMP-7 + 50 ng/ml bFGF , Osteovit®'te 50 ng/ml rhBMP-7'de fazla ve Chronos®'ta kontrolle göre % 4 az 50 ng/ml rhBMP-7 verilen kültürlerde gözlemlenmiştir. BMP-4 üretimi kontrollere göre Bio-Oss®'ta 100 ng/ml bFGF'te fazla , Osteovit®'te 100 ng/ml bFGF'te % 35 az ve Chronos®'ta 50 ng/ml rhBMP-7 verilen kültürde % 49 az gözlemlenmiştir. VEGF üretimi kontrollere göre Bio-Oss®'ta 50 ng/ml bFGF'te % 11 az, Osteovit®'te 50 ng/ml rhBMP-7' de fazla ve Chronos®'ta kontrolle göre 50 ng/ml rhBMP-7 verilen kültürde % 9 az gözlemlenmiştir. Sonuç olarak damarlanma yani anjiyogenez Osteovit®'te diğerlerine oranla fazla, yeni kemik oluşumu Bio-Oss®'ta daha fazladır denilebilir.

Bio-Oss®, Chronos® ve Osteovit® ile rh-BMP-7 ve bFGF kullanılarak yapılmış bir çok araştırmalar vardır ama üçünü bir arada kullanıp karşılaştırma yapılmış bir araştırma yoktur. Bu konu ilk olarak bu araştırmada denenmiştir.

Burda önemli olan kültürlerdeki materyallerin yapıları, nelerden oluştukları ve hangi konsantrasyonlarda büyüme faktörlerinin verildiğidir. Büyüme faktörleri belirli oranda yeni kemik oluşumunu desteklerken, optimal konsantrasyonlardan az veya çok eklenmesi osteoblastların gelişiminde olumsuz etkiler yapabilir. Materyallerin yapıları hücrelerin tutunması ve porlar arasında köprüler oluşturması açısından önemlidir. İçerdikleri maddeler sonradan materyallin ortamda absorbe olması, alerjik reaksiyonlar oluşmaması ve doku ile uyumu açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- AÇIL, Y. & MÜLLER, P. K. (1995).** Rapid method for isolation of the mature collagen crosslinks, hydroxylslylpyridinoline and lysylpyridinoline. J Chromatogr A44:183-188.
- AÇIL, Y., TERHEYDEN, H., DUNCHE, A., FLEINER, B. & JEPSEN, S. (2000).** Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. J Biomed Mater Res 51:703-710.
- AÇIL, Y., SPRINGER, I., BROEK, V., TERHEYDEN, H. & JEPSEN, S. (2002).** Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. J Cell Biochem 86:90-98.
- AKAY, M. C., GÜNBAŞ, S., ERTÜRK, S., 1999.** Benign Odontojen Tümörlerin SDAS Kemik Greftleri ile Tedavisi (2 Olgu Nedeniyle). Akademik Dental 1 (3): 100- 4.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. 1995.** Molekularbiologie der Zelle. VCH- Verlagsgesellschaft, Weinheim, 3. Auflage, Kap. 4, 7, 12.5, 16.5.6, 16.5.7, 19.3.8-22.7.
- ALPASLAN, C., ALPASLAN, G., OYGÜR, T., 1994.** Bone Reaction to Subperiosteally implanted Hydroxyapatite/ Collagen/Glycosaminoglycans and Coral in the Guinea Pig . Oral Surg Oral Med Oral Pathol . 77 : 335-40 .
- ARCHER, W. H., 1994.** Oral and Maxillofacial Surgery Vol II VVBSaunders Company. 197525. Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG.: Bone Grafts, Derivates and Substitutes. Utterworth-Helemann Company.Oxford, 3- 80.
- ARINCI, A., 1999.** Clinical Experience of Allograft material at Mandibular Reconsruction after tumor resection. Med.Bull. of İstanbul Med. Fac. 32:2 .
- AYBAR, B., YAZAR, T. T., GÜREL, A., EMES, Y., YILDIRIM, F., YEŞİLDERE, T., 2000.** Deneysel kemik defektlerinin onarımında yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR)' nun ve YDR ile birlikte değişik kemik greftlerinin birlikte uygulanmasının histopatolojik olarak araştırılması, İst. Tıp Fak. Mecmuası 63:2.

- BESHO, K, KUSUMOTO, K, FUJIMURA, K, KONISHI, Y, OGAWA, Y, TANI, Y, LIZUKA, T., (1999)** Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 37: 2-5.
- BOYNE, P. J., 2001.** Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am*; 83: 146-150.
- BOYNE, P. J, NATH, R, NAKAMURA, A., 1998.** Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 36: 84-90.
- BROEK, VJ., 2003.** In-vitro Stimulierung humaner Osteoblasten und Fibroblasten durch rhBMP-7 auf Verschiedenen Knochenersatzmaterialien und 2 Membranen, Doktora tezi, CAU, Kiel.
- BURCAK, G. C., 2002.** “Hormonların genel özellikleri” Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. (derleyenler), İnsan Biyokimyası, Ankara, Palme Yayıncılık, s. 437.
- CAFFESSE R. G., NASJLETI C. E., 1992.** Response to an absorbable membrane for guided tissues regeneration in dogs. *J Dent Res* 71:297.
- COCHRAN, D. L., SCHENK, R., BUSER, D., WOZNEY, J. M., JONES, A. A., 1999.** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol*; 70: 139-150.
- CRANIN, N. A., KLEIN, M., SIMONS, A., 1993.** Atlas of Oral Implantology pp.194-212, 1st ed Thieme Medical Publishers Inc, New York .
- CURTIS T. A., WARE W. H., 1997.** Autogenous bone graft procedures for atrophic edentulous mandibles. *J Prosthet Dent* 38: 366.
- ÇETİN, M., ÇAPAN, Y., 2004.** bFGF (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü) ve Formülasyonlarında Yeni yaklaşımlar, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 24, Sayı 2, ss.107-124.
- DAHLIN C., SANDBERG E., ALBERIUS P., LINDE A., 1994.** Restoration of Mandibular Nonunion Bone Defects: An experimental Study in Rats Using an Osteopromotive Membrane Method. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23: 237.

- EYRE, D. R., 1981.** Crosslink maturation in bone collagen. In Veiss, A. (Hrsg.) The chemistry and biology of mineralized connective tissue, Elsevier NorthHolland, New York, S. 51-55.
- FAYETTE J., SORIA JC., ARMAND JP., 2005.** Use of angiogenesisinhibitors in tumour treatment, Eur J Cancer, 11:517-524.
- FONSECA R. J, WALKER R. V., 1991.** Oral and Maxillofacial Trauma Vol II . W B Saunders Company. 87:243-273.
- FONSECA R. J, WALKER R. V., 1997.** Oral and maxillofacial Trauma, pp.1073-1096, 2nd Ed, WB Saunders, Philadelphia.
- FONSECA R. J, DAVIS W. H., 1995.** Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery, pp. 41-64, 2nd ed, WB Saunders, Philadelphia.
- FUJIMORO, K., BESSHO, K., KUSUMOTO, K., KONISHI, Y., OGOWA, Y., LIZUKA, T., 2001.** Experimental osteoinduction by recombinant human BMP-2 in tissue with low blood flow: a study in rats. Br J Oral Maxillofac Surg; 39: 294-300.
- GAZDAĀ, A.R., LANE, J.M., 1995.** Alternatives to autogenous Bone Graft, J Am Acad Orthop Surg, 3: 1-8.
- GANTES B. G., SYNOWSKI B. N., GARRETT S., EGELBERG J. H., 1991.** Treatment of periodontal furcation defects. Mandibular class III defects. J Periodontol 62:361 .
- GANZ S. D., 1997.** Mandibular tori as a source for onlay bone graft augmentation: a surgical procedure: Pract Periodontics Aesthet Dent 9: 373.
- GORDH, M., ALBERIUS, P., JOHNELL, O., LINDBERG, L., LINDE, A., 1999.** Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grefting. Plast Reconstr Surg;103: 1909-1918.
- GOULET, J. A., SENUNAS L. E., De SILVA G. L., GREENFIELD V. H., 1997.** Autogenous iliac cret bone graft: Complications and Functional assessment. Clin Orthop Rel Res 339: 76.

- HOWELL, T. H., FIORELLINI, J., JONES, A., ALDER, M., NUMMIKOSKI, P., LAZARO, M. et al., 1997.** A feasibility study evaluating rhbmp-2 absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*; 17:125-139.
- HURZLER, MB, KOHAL, RJ, NAGHSBANDI, J, MOTA, LF, CONRADT, J, HUTMACHER, D, et al, (1998)** Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *J Oral Maxillofac Surg*, 27: 315.
- JARCHO, M., 1981.** Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop*, 157: 259-278.
- KIELTY, C. M., HOPKINSON, I., GRANT, E. M., 1993.** The collagen family: structure, assembly and organization in the extrazellular matrix. In: Royce P. M., Steinmann B. (Hrsg.), *Connective tissues and its heritable disorders*, S. 103-147, Wiley-Liss, New York.
- KÜBLER, N. R., WÜRZLER, K., 1998.** Bone morphogenetic proteins. *Implantol* 6, 177-192.
- LEVENT, Y., GUERO, S., GUILLEMIN, G., 1988.** Utilisation du Corail en Remplacement de Greffes asseuses en Chirurgie Faciale Quatre ans de Recul. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthetique* 33 (3) :279-282.
- MA, Q., MAO, T., LIU, B., ZHAO, J., CHEN, F., WANG, H., ZHAO, M., 2000.** Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral,type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 38:561-594.
- MARTINEZ S. A., WALKER T., 1999.** Bone grafts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 29:1207.
- MATIN, K., NAKAMURA, H., IRIE, K., OZAWA, H., EJIRI, S., (2001).** Impact of rhBMP-2 on residual ridge resorption after tooth extraction: an experimental study in the rat.*Int J Oral Maxillofac Implants*, 16: 400-411.

- MCKAY I. A., 1993.** “Types of growth factor activity: detection and characterization of newgrowth factor activities” McKay, I., Leigh, I. (derleyenler), Growth factors; A practical Approach, New York, Oxford University Press, s. 195.
- MOEHLER, T.M., HO, A.D., 2003.** Angiogenesis in hematologic malignancies. Crit Rev Onkol Hematol, 45:227-244.
- ORNITZ, D. M., ITOH, N., 2001.** Fibroblast growth factors, Genome Biol., 2, 3005.1-3005.12.
- ÖZEÇ, I., YELER, H., 2003.** Bone Morphogenetic Proteinler ve Osteoindüksiyon, Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek. Fak. Dergisi, Cilt:6, Sayı:1, Sivas.
- PAPACHARALAMBOUS, S. K, ANASTASOFF, K. I., 1993.** Natural Coral Skeluton used as Onlay Graft for Contour Augmentation of the Face . A preliminary report . Int J Oral and Maxillofar Surg 22:260-264.
- PASETTI, P., 1994.** Bone harvesting from the oral cavity. Int J Dent Symp 2:46.
- PETERSON L. J, INDRESANO A. T, MARCIANI R. D., ROSE S. M., 1992.** Principles of Oral and Maxillofacial Surgery Vol II. J.B.Lippincott .sf. 246.
- POLSON A. M, HEIJL L. C., 1978.** Osseous Repair in Intrabony Periodontal Defects J Clin Periodontol 5:13.
- REDDI, A.H., 1994.** Bone and cartilage differentiation. Cur Opin Gen Dev 4, 737 -744.
- REN, J., FINKLESTEIN, S. P., 1997.** Time window of infact reduction by intravenous basic FGF in focal cerebral ischemia, Eur. J. Pharm., 327, 11-16.
- ROLDAN, J. C., JEPSEN, S., SCHMIDT, C., KNÜPPEL, H., RUEGER, D., AÇIL, Y. & TERHEYDEN, H. (2004).** Sinus floor agumentation with simultaneous placement of dental implants in presence of platelet-rich plasma or recombinant bone morphogenetic protein-7. Clin Oral Impl Res 15: 716.
- SANDHU, HS, KANIM, LE, KABO, JM, 1996.** Effective doses of rekombinant human BMP-2 in experimental spinal fusion. Spine, 20, 2669-2682.
- STARTYM, S.M., FOITZIK, C., 1998.** Sinus floor elevation with Autologous Bone and Cerasorb, 1. Histological & Radiolpgical Studies.sf.134

- SUGIMORI, H., SPELLER, H., FINKLESTEIN, S. P., 2001.** Intravenous basic fibroblast growth factor produces a persistent reduction in infarct volume following permanent focal ischemia in rats, *Neurosci. Lett.*, 300, 13-16.
- SCHWARTZ, Z, SOMERS, A, MELLONIG, JT, CARNES, DL Jr, WOZNEY, JM, DEAN, DD, COCHRAN, DL, BOYAN, BD.,(1998)** Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. *J Periodontol*; 69: 1337-45.
- URIST, M.R., SILVERMAN, B.F., BURING, K., et al., 1967.** The Bone Induction Principle. *Clin Orthop Rel Res*, 53: 243-283.
- WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK, LM, WHITTERS, MJ, KRIZ, RW, HEWICK, RM, WANG, EA., 1988.** Protein factors involved in bone formation. *Science*; 242: 1528-
- YAMAUCHI, M., KATZ, E. P., 1993.** The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connect Tissue Res* 29, 81-98.
- YAZAR, T. T., 1998.** Sürekli Kemik Defektlerinde YDR'in Osteogenesis Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul, sayfa: 16.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Yahyalı´ da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana´ da tamamladım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2001 yılında Lisans eğitimimi tamamlayarak aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2001-2003 yılları arasında Hava Kuvvetleri Komutanlığı 10. Tanker Üssü İncirlik Sağlık Amirliğinde çalıştım. 2003 yılında Christian Albrechts Üniversitesinde almanca dil eğitimine başladım. Şimdi Christian Albrechts Üniversitesi, Diş, Ağız, Çene ve Yüz Cerrahisi Kliniği Araştırma Laboratuvarlarında çalışmaktayım.