

**HAYVAN MODELLERİNDE “TGF-β3” VE “BMP-2” SALAN
DOKU İSKELELERİ İLE DAMAK YARIĞI ONARIMI**

**CLEFT PALATE REPAIR IN ANIMAL MODELS WITH
“TGF-β3” VE “BMP-2” RELEASING SCAFFOLDS**

AYBÜKE ALICI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Tülin Kutsal

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Erhan Pişkin

Üye (Danışman) :.....
Yrd. Doç. Dr. Kamile Öztürk

Üye :.....
Prof. Dr. Petek Korkusuz

Üye :.....
Doç. Dr. İbrahim Vargel

ONAY

Bu tez/...../.....tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

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

Prof. Dr. Adil Denizli

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

HAYVAN MODELLERİNDE “TGF-β3” VE “BMP-2” SALAN DOKU İSKELELERİ İLE DAMAK YARIĞI ONARIMI

Aybüke Alıcı

ÖZ

Sunulan tezin amacı, damak yarıklarının onarımında kullanılmak üzere farklı rejimlerde büyüme faktörü salan doku iskelelerinin üretilmesidir. Tez kapsamında ilk olarak, hazırlanan jelatin filmlere (%3 m/v damıtık su içerisinde) 2 farklı büyüme faktörü yüklenmiştir. Büyüme faktörlerinden ilki, hücre transformasyonunu tetikleme yeteneği sebebiyle ve eksikliklerinde damak yarıklarının oluşumuna sebep olan dönüştürücü büyüme faktörü β3 (TGF-β3), ikincisi mineralize kemik oluşumunu uyarma potansiyeli sebebiyle kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2)'dir. Büyüme faktörü içermeyen, yalnız BMP-2, TGFβ-3 ve BMP-2'nin birlikte yüklendiği üç farklı formda jelatin film daha sonra poli(L-laktat) (PLA) ve poli(ε-kaprolakton) (PCL) polimerik gözenekli doku iskelelerine yerleştirilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde deney hayvanlarında (Wistar sıçanları) cerrahi işlem ile kendiliğinden iyileşmeyen (kritik boyutlu) alveol defektleri oluşturulmuştur. Hasarlı bölgeye, biyoaktif ajan yüklenmemiş (boş), yalnız BMP-2 yüklenmiş ve ayrı ayrı TGF-β3 ve BMP-2 yüklenmiş jelatin filmleri içeren 3 farklı türdeki laminat doku iskeleleri deney hayvanlarına yerleştirilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak seçilen grupta alveol defekti oluşturulup denekler başka işleme maruz bırakılmamıştır. Pozitif kontrol grubu olan otogreft grubunda ise deneğin iliyak kemiğinden alınan otogreft hasarlı bölgeye implante edilmiştir. 2 farklı zaman diliminde incelenecek olan toplam 10 grubun her birinde 7 deney hayvanı kullanılmıştır (10 grup; n=70). 1. ve 4. aylarda sakrifiye edilen hayvanların defekt bölgelerinden alınan örnekler önce makroskopik olarak ve sonrasında mikro-CT analizleri yapılarak yeni kemik dokusunun hacimsel değeri hesaplanmıştır. Yapılan micro-CT incelemelerinde 1 aylık dönemin sonunda otogreft grubunda yeni kemik oluşumu gözlenirken, grupların kendi içlerindeki zamana bağlı karşılaştırmalarında yalnız TG-β3/BMP-2 grubu anlamlı bir farklılık göstermiştir. Örnekler micro-CT incelemeleri sonrasında histolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Bu incelemelerde hematoksin, eozin ve masson trikrom ile boyanmış, kesitler defekt iyileşmesi, yeni kemik oluşumu ve doku cevabı açısından değerlendirilmiştir. Histolojik çalışmalardan elde edilen

veriler 1. ve 4. aylarda otogreft grubunda hızlı bir iyileşmenin olduğunu gösterirken 4. ayda BMP-2 ve TGF- β 3/BMP-2 gruplarının otogreft grubundaki yeni kemik oluşum değerlerine en yakın sonuçları verdiği saptanmıştır.

Ayrıca osteoblastlarca kana salınan alkalen fosfotaz'ın (ALP) kemiğe özgü formu olan kemik spesifik alkalen fosfataz (BALP) tayini için 21. günde ve 4. ayda deneklerden kan toplanmış ve serumlarından ELİZA yöntemi ile BALP derişimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 21. günde ölçülen BALP derişiminde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat 4.ayda BALP aktivitesinde otogreft ve TGF- β 3/BMP-2 gruplarında anlamlı bir artış saptanmıştır. Paralel olarak yapılan moleküler testler ile TGF- β 3 ve BMP-2'nin in vivo kemik oluşumuna etkisi, osteoblast farklılaşması ve çoğalmasında moleküler belirteç olarak kullanılan genlerin (osteokalsin, osteonektin, alkalen fosfataz, kemik siyaloproteini, runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 ve tip I-kollajen) ifade düzeylerinin saptanmasıyla moleküler düzeyde değerlendirilmiştir. Gen ifade düzeyleri, gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır (5 grup; n=25). Gen ifade düzeylerinin zamana bağlı değişimi 7. günde biyopsi alınıp, 21. günde sakrifiye edilen deneklerden alınan örneklerle çalışılarak değerlendirilmiştir. Her grupta sözü geçen genlerin ifade düzeylerinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Diğer sonuçlarla da paralellik göstererek TGF- β 3/BMP-2 grubunda kemik oluşumunda rol oynayan genlerin ifade düzeylerinde oldukça anlamlı artışlar gözlenmiştir

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, biyobozunur polimerler, damak yarıkları, jelatin, TGF β -3, BMP-2

Danışman: Prof.Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik AD. ;
Yardımcı Danışman: Yard. Doç. Dr. Kamile Öztürk, Aksaray Üniversitesi Biyoloji Bölümü

CLEFT PALATE REPAIR IN ANIMAL MODELS WITH “TGF- β 3” VE “BMP-2” RELEASING SCAFFOLDS

Aybüke Alıcı

ABSTRACT

The aim of this thesis is to produce scaffolds that release growth factors in different regimes in order to use them in cleft palate repair. In the context of the study, 2 different growth factors were loaded to gelatin films (3% m/v in H₂O). The first growth factor was TGF- β 3 since in the absence of it cleft palate may appear and at the same time it has the ability to trigger the cell transformation and the second factor was BMP-2 due to its potential to induce the mineralized bone generation. In this part of the thesis, gelatin films were prepared in 3 different groups as unloaded (no growth factor were loaded), BMP-2 loaded and TGF β -3 loaded. The gelatine films, both unloaded and loaded with growth factors, were placed into the poly(L-lactate) (PLA) and poly(ϵ -caprolaktone) (PCL) polymeric scaffolds.

In the second part of the thesis, cleft palates were created with surgical operation in the experimental animals (Wistar rats). The scaffolds without bioactive agents and “TGF- β ” and “BMP-2” loaded gelatine films containing scaffolds were placed into the defects of the experimental animals (10 group ;n=70) in a suggested model (only BMP-2 loaded gelatine film placed scaffolds, separately loaded “TGF- β ” and “BMP-2” placed at the same scaffold). An alveolar defect was created in the negative control group and no other operations exposed to these animals. In the positive control group, the otograft which was taken from animal’s iliac bone was implanted to the defect side. 7 experimental animals were used for each group in 2 different time periods, and the volumetric values of the newly formed bone tissues were measured through first taking microscopic and then micro-computerized tomography (micro-CT) from the defect areas of the animals, by sacrificing at the 1st and the 4th month. After the period of a month new bone formation observed in the autograft group whereas due to time dependent comparison of groups within themselves only TGF- β 3/BMP-2 group showed a significant difference.

Samples were put into histological observation after micro-CT analysis. Fractions that were dyed with haematoxylin, eosin and masson trichrome were evaluated in the context of recovering defects, new bone generation and tissue response. Data obtained from histological studies showed that there was a quick regeneration in autograft group in 1st and 4th months whereas BMP-2 and TG- β 3/BMP-2 groups showed closer results to new bone generation values of autograft groups in 4th month.

Moreover, for the measurement of BALP, which is the specific bone form of the ALP that is released to the blood via osteoblasts, in each 21th days and 4th months, blood has been gathered and from their serum, BALP concentrations were examined through the ELISA method. BALP concentrations measured on 21th day no significant difference was observed. However in the 4th month there was a significant increase in BALP activity in autograft and TG- β 3 / BMP-2 groups. The genes that were used as molecular indicators (osteocalcin, osteonectine, alkaline phosphatase, bone sialoprotein, runt related transcription factor and type I collagen) for the formation of in vivo, bone, osteoblast differentiation and proliferation were selected and the level of gene expressions were determined to evaluate the effect of TGF- β 3 and "BMP-2". Gene expression levels were determined using real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method (5 groups, n=25). Time dependent changes of gene expression levels was assessed by working with the samples that were obtained from experimental animals from which biopsy were taken on 7th day and which were sacrificed on 21th day. Significant differences were obtained in expression levels of the genes mentioned. Parallel to the other results there observed very significant increases in the expression levels of genes that play role in bone regeneration in TGF- β 3 / BMP-2 groups.

Keywords: Bone tissue engineering, biodegradable polymers, cleft palates, gelatine, TGF β -3, BMP-2

Advisor: Prof.Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Bioengineering Division;

Co-Advisor: Assistant Prof.Dr. Kamile Öztürk, Aksaray University, Department of Biology.

TEŞEKKÜR

Sunduğu olanaklarla, fikirlerle pek çok şey öğrenmemi sağlayan saygıdeğer hocam Erhan Pişkin'e

Bizden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocamız Tülin Kutsal'a

Azmiyle, çalışkanlığıyla bana hep örnek olan, bilgisiyile, fikirleriyle yol gösteren ve bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan değerli hocam İbrahim Vargel'e

Tezimin moleküler çalışmalarını ve bilgilerimi borçlu olduğum saygıdeğer hocam Kamile Öztürk'e

Çalışmalarımda yer alan, yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocam Petek Korkusuz'a

Yardımları ve katkıları için laboratuvar arkadaşlarım Araz, Ayfer, Ebru, Erdinç, Gökhan, Güneş, Hulusi, Kourosh, ve Zeynep'e

In vivo deneylerdeki ve m-CT çekimlerindeki yardımlarıyla İlyas'a

Her türlü yardım ve destekleri için Burcu Çelen, Burcu Otman ve Nihan'a

Burda öğrendiklerimin birçoğunu borçlu olduğum ve yardımlarıyla her işimi kolaylaştıran eski topraklar Filo, Halil, Sedat ve Tolga'ya

Bu tezin çok büyük kısmını borçlu olduğum, her sorumu gece gündüz demeden yanıtlayan ve karşılıksız sonsuz yardımda bulunan Seda'ya

Okyanusun ötesinden bile desteklerini hiç esirgemeyen, bana hep güvenen ve umut veren dostum kardeşim Asyacığım, anlamadığı çevirileri bile sabırla yapan bitaneciğim Ayça'ya, benimle sabahlayıp yardımlarını ve neşesini eksik etmeyen Çiko'ya (İlgin'a), ,

Sözlerin ifade edemeyeceği hayatım, herşeyim Boram'a

Hayatımdaki her sevincimi, başarıımı, mutluluğumu borçlu olduğum annem ve babama, varlıklarıyla bile en kötü anlarımı huzura dönüştürebilen kardeşlerim Burak ve Elif'e

Sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.2 Greftler	8
2.2.1 Otolog Kemik Greftleri (Otogreftler).....	8
2.2.1.1 Otolog Kansellöz Kemik Greftleri.....	8
2.2.1.2 Kortikal Kemik Otogreftleri.....	9
2.2.1.3 Kansellöz Kemik Otogreftleri	9
2.2.1.4 Kemik İliği	9
2.2.2 Allojen Kemik Greftleri (Allogreftler)	9
2.2.3 Ksenojenik Kemik Greftleri (Xenogreftler)	10
2.2.4 İzojen Kemik Greftleri	10
2.3 Kemik Dokusu	10
2.3.1 Kemik İyileşmesi.....	14
2.3.1.1 Primer Kırık İyileşmesi.....	15
2.3.1.2 Sekonder Kırık İyileşmesi	15
2.3.2 Kemik Belirteçleri.....	17
2.3.2.1 Transkripsiyon Faktörleri	17
2.3.2.2 Matriks Proteinleri.....	18
2.4 Doku Mühendisliği	21

2.5 Kemik Doku Mühendisliği	23
2.5.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri.....	23
2.5.2 Dönüştürücü Büyüme Faktörleri (TGF- β)	24
2.5.3 Kemik Morfogenetik Proteinleri.....	25
2.6 Doğal polimerler	26
2.6.1 Jelatin	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	31
3.1 TGF β -3 ve BMP-2 Yüklü Jelatin Filmlerin Sentezlenmesi	31
3.2 Poli(L-laktat)/Poli(ϵ -kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi ve Polimerik Blendlerin / Doku İskelelerinin Hazırlanması	31
3.2.1 Poli(L-laktat)/Poli(ϵ -kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi	31
3.2.2 Polimerik Blendlerin Hazırlanması.....	32
3.2.3 Poli(L-laktat)/Poli(ϵ -kaprolakton) Doku İskelelerinin Hazırlanması	33
3.3 TGF β -3 ve BMP-2 Yüklü Jelatin Filmlerin Doku İskelelerine Yüklenmesi.....	34
3.4 TGF β -3 ve BMP-2 Yüklü Jelatin Filmleri içeren Doku İskelelerinin Damak Yarığı Onarım Malzemesi Olarak Büyüme Faktörleriyle ve / veya Yalnız Başına İncelenmesi (In Vivo).....	34
3.4.1 Skafoldların hazırlanması ve sterilizasyon.....	34
3.4.2 Hayvan Deneyleleri	35
3.5 Gen İfade Düzeyi Çalışmaları.....	36
3.5.1 RNA izolasyonu	36
3.5.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi	37
3.5.3 Real Time PCR	38
3.6 Histoloji ve Histomorfometri Çalışmaları.....	41
3.7 Mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) ile Radyomorfometrik Analiz.....	41
3.8 Biyokimyasal Çalışmalar	42
3.9 İstatiksel Çalışmalar	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	44

4.1 In-vivo Çalışmalar.....	44
4.2 Gen ifade Düzeyi çalışmaları.....	45
4.2.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	45
4.3 Alkalen Fosfataz Aktivitesi.....	50
4.4 Mikro-bilgisayarlı Tomografi (μ -CT) ile Radyomorfometrik Analiz.....	52
4.5 Histolojik Bulgular.....	55
5. SONUÇLAR	60
6. KAYNAKLAR.....	62
EK-1 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı.....	74
EK-2 Dokudan RNA İzolasyon Protokolü	75
EK-3 Gen ifade düzeyi analizleri tablosu.....	77
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Primer ve sekonder damak gelişimi ve etkin olan genler	7
Şekil 2.2 Kemik hücreleri	14
Şekil 2.3 Kırık iyileşmesi dönemleri	15
Şekil 2.4 Kemik onarımı	17
Şekil 2.5 Runx2'nin regülasyonu ve etkilediği yollar	18
Şekil 2.6 OC'nin regülasyonu	20
Şekil 2.7 Kemik oluşumunun moleküler düzenleyicileri	21
Şekil 2.8 Kollajenden 2 farklı yolla jelatin saflaştırılması	29
Şekil 3.1 Isı ve katalizör varlığında poli(L-laktat) polimerizasyon reaksiyonu	32
Şekil 3.2 Isı ve katalizör varlığında poli(ϵ -kaprolakton) polimerizasyon reaksiyonu	32
Şekil 3.3 Deney hayvanlarında cerrahi işlem ile yaratılan alveol defektlerine implante edilen jelatin film içeren örnek doku iskelesinin optik fotoğrafı	34
Şekil 4.1 A)Sıçan damağının ağız içinden görünümü B)Sıçanlarda oluşturulan alveolar kemik defektinin yandan görüntüsü.....	45
Şekil 4.2 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin Runx2 geninin ifade düzeyine etkisi.....	46
Şekil 4.3 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin ALP geninin ifade düzeyine etkisi.....	47
Şekil 4.4 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin COL1a1 geninin ifade düzeyine etkisi.....	47
Şekil 4.5 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin BSP geninin ifade düzeyine etkisi.....	48
Şekil 4.6 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin OC geninin ifade düzeyine etkisi.....	48
Şekil 4.7 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin SPARC geninin ifade düzeyine etkisi.....	49
Şekil 4.8 Kontrol, otogreft, skafold/boş jelatin, BMP-2, TGF β -3/BMP-2 gruplarına ait 4. ay BALP aktivitesi.....	51

Şekil 4.9: Kontrol (defekt) grubunun 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar	52
Şekil 4.10: Otogreft grubunun 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar.....	53
Şekil 4.11 Scaffold/Boş jelatin grubunun 1.ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar	53
Şekil 4.12 Scaffold/BMP-2 grubunun 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar	54
Şekil 4.13 TGF β -3/BMP2 grubuna ait 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar	54
Şekil 4.14 Çenenin operasyon görmeyen sol segmentindeki toplam kemik hacmi farkının çenenin sağında alveol defekti oluşturulan segmentindeki toplam kemik hacmin yüzde farkına ait grafik.....	55
Şekil 4.15 1.ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları.....	57
Şekil 4.16 4.ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları	58
Şekil 4.17 1. ay sonuçlarına ilişkin histomorfometri grafiği	59
Şekil 4.18 4.ay sonuçlarına ilişkin histomorfometri grafiği	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge: 3.5.2.1 cDNA programında Otomatik Isı Döngüsü Programı.....	37
Çizelge: 3.5.2.2 cDNA RT-PCR tepkime karışımı	38
Çizelge 3.5.3.1 Real Time PCR programı	39
Çizelge 3.5.3.2.Spesifik primer ve UPL prob sekansları.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen Fosfataz
BMP	: Kemik Morfogenik Proteini
BDGF	: kemikten türetilmiş büyüme faktörü
BSP	: Kemik siyaloprotein
BALP	: Kemik alkalen fosfataz
COL-1	: Tip 1 Kollajen
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ECM	: Hücre dışı matriksi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
IL-1	: İnterlökin-1
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
OC	: Osteokalsin
PHAs	: Polihidroksialkanoatlar
PDGF	: Trombositten üretilmiş büyüme faktörü
PCL	: Poli(ϵ -kaprolakton)
PLLA	: Poli(L-laktat)
RGD	: Arjinin-glisin-aspartat
Runx2	: Runt ilişkili transkripsiyon faktörü
RANKL	: Nükleer faktör kapa b ligandı reseptör aktivatörü
RhBMP-2	: Rekombinant insan kemik morfogenik proteini
SPARC	: Osteonektin
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TNF-a	: Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1.GİRİŞ

Dudak, damak veya alveol kemik defektleri en yaygın olarak karşılaşılan konjenital kraniyofasiyal anomaliler arasındadır ve tedavileri için, birbirine göre avantaj ve dezavantajları olan birçok cerrahi yöntem tanımlanmıştır [1, 2]. Alveol defektlerinin günümüzdeki tedavi yöntemleri; genel olarak yakınındaki yumuşak dokunun hasarlı bölgeye yönelmesi ve ikincil olarak yarık hattındaki defektli sert dokunun kansellöz kemik grefti ile (kalça-ilyak-kemiğinden alınan) doldurulması şeklinde özetlenebilen iyi tanımlanmış cerrahi yöntemlerdir.

Alveolar kemik defektlerinin onarılması için iliyak kemikten alınan kansellöz kemik otogreftlerinin kullanılması çoğu cerrahın tercih ettiği bir tekniktir. İliyak kemik greftlerinin alınması ve greftin alıcı yatağa yerleştirilmesi hematoma, duyu siniri yaralanması, skar oluşumu ve enfeksiyon gibi olası komplikasyonlarında beraberinde getirmesine karşın, bu otogreftler osteoblastları, kemik elemanlarını ve mezenkimal hücreleri de içeren üç boyutlu canlı dokular olduğundan osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon potansiyellerine de sahiptirler. Hastanın uygun bir verici (donör) bölgesinden alınan otogreftlerin alveol defektlerinde oldukça başarılı bir şekilde kullanıldıklarını söylemek mümkündür [9]. Greftin başarılı olmasında hem greftteki hem de yarığı çevreleyen alveolar kemikteki osteojenik faktörlerin, ekstraselüler kemik matriks proteinlerinin, mezenkimal hücrelerin, çeşitli büyüme faktörlerinin etkili olduğu söylenebilir. Bunların yarattığı kemik oluşumunu uyarma (osteoindüktif) ve kemiğin içe büyümesini etkinleştirme (osteoindüktif) etkisi ile hem otogreftin çevre kemiğe entegrasyonunu hem de yeni kemik dokusunun oluşumunu gerçekleştirdiği ifade edilmektedir [9].

Osteojenik potansiyeli olan faktörlerden kemik morfogenetik proteinleri, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) beta süper ailesinin bir parçası olan bir grup endojen proteindir. Bu proteinler, embriyolojik büyüme ve iskelet oluşumu ile ilgilidirler. Tam oluşmuş bir iskelet, bu proteinleri çok az miktarlarda içermektedir ve bu kemiğin varlığını sürdürmesi ve kırık iyileşmesi ile ilgilidir. Kemik morfogenetik proteini (BMP)-2'nin hayvanlarda osteoblast aktivitesini uyardığı ve kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [10-11]. Kemik mineralleşmesinin doğası hakkında temel araştırmaları yürüten bir ortopedi cerrahı olan Marshall Urist, bu ajanların varlıklarını ve rollerini kavramlaştıran ilk kişidir. 1971 yılında Urist ve

Strates, bu ajanları ifade etmek için kemik morfogenetik proteini terimini kullanmışlardır ve çok miktarda kemiğin saflaştırılması ile az miktarda BMP izolasyonunu başarmışlardır [12]. Wozney ve arkadaşları ise rhBMP-2 (rekombinant insan kemik morfogenetik proteini) proteinini kodlayan geni klonlamayı başarmışlardır [13]. Günümüzde rekombinant teknoloji ile rhBMP-2 saf olarak büyük miktarlarda üretilebildiği için klinikte ve laboratuvarlarda kullanılabilir. rhBMP-2 uygun bir ortama konulduğunda yeni baştan kemik oluşumunu sağlayabilmektedir. rhBMP-2, defekt alanında bulunan kök hücrelerin kemik oluşturan hücrelere farklılaşmasını sağlamaktadır. Morfogenez olarak adlandırılan bu süreç, bu yeni ajanlarla benzersiz bir şekilde işler. Yaygın klinik öncesi ve klinik çalışmalar, rhBMP-2'nin etkinliğini ve güvenilirliğini göstermiştir. Chin ve Boyne insan dışı primatlarda rhBMP-2'nin alveolar distraksiyon bölgelerindeki iyileşmeyi arttırdığını rapor etmişlerdir [14]. Chin ve arkadaşları, insanlarda alveolar distraksiyon uygulamalarında rhBMP-2'yi kullanmışlardır [15]. Chin ve Carstens yüz ve kafatası yarıklarında, yarık boyunca, rhBMP-2'nin kemik bütünlüğünün sağlanmasında etkili olduğunu bulmuşlardır [16].

TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'ün fare damağının gelişmesi süresince temporal ve uzamsal ekspresyonu ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bu deneysel çalışmalarda, damak kenarlarının uzaması ve birleşmesi dönemlerinde TGF- β 'ların düzenleyiciler gibi etki ettikleri öne sürülmüştür. TGF- β 3'ün ekspresyonu, ikincil damak birleşmesinden hemen önce (farede embriyolojik olarak 13,5. gün) medial kenar epitelinde lokalize olmuştur [17, 18]. TGF- β 3 geni kapatılmış fare oluşturulması ile TGF- β 3 geni eksik fare yavruları, doğumdan sonraki 24 saat içinde ölmüşlerdir [19]. Belirgin bir zıtlıkta, TGF- β 1 geni kapatılmış farelerde damak yarığı oluşmamıştır [20,21]. Düşük sıklık oranlarında (23%) damak yarığı gözlenen TGF- β 2 geni kapatılmış farelerde fazladan birçok diğer anomaliler de ortaya çıkmıştır [22]. Buna ek olarak, TGF- β 3'ün damak kenarlarının birleşmesinde vazgeçilmez bir rol oynadığına dair düşünce, normal TGF- β 3 aktivitesinin, antisens oligonükleotid veya nötralize edilmiş antikör yoluyla engellenmesini takiben in vitro olarak damak oluşumu sırasında birleşme bozukluğunun oluşmasıyla doğrulanmıştır [23].

Damak yarığı doğuştan olduğu için, tedavide kullanılacak mevcut damağı kapatmak için otogreft alınacak bölge çoğu durumlarda yetersizdir. Dolayısıyla oldukça sık karşılaşılan bu sorunun giderilmesi için alternatif yöntemler gerekir. Kemik doku mühendisliği bunlardan biri olarak değerlendirilmektedir. Klasik kemik doku mühendisliği uygulamalarında; aktif kemik hücreleri (osteoblastlar) izole edilir, bu primer hücreler in vitro hücre kültürlerinde çoğaltılır, vücuttaki ekstrasellüler kemik matriksini taklit etmesi beklenen makrogözenekli, gözenekleri geniş ve birbiriyle bağıntılı olan (açık gözenek yapısında) biyobozunur doku iskelelerine yüklenir. Bu hibrid yapılar doku onarımı için defektli bölgeye yerleştirilir. Bazı durumlarda doku iskeleleri içinde (biyoreaktörlerde, vb.) kemik hücrelerinin üç boyutlu dağılıp-büyümesi hatta ön kemik dokusunun oluşturulması sağlanır ve bu biyohibrid yapılar onarımda kullanılır [24]. Son yıllarda, primer kemik hücreleri yerine özellikle mezenkimal kök hücrelerin kullanılması yönünde bir eğilim vardır [25]. Ancak hem primer hem de (özellikle) kök hücrelerin kullanımında çok sıkı düzenlemeler vardır (özellikle gelişmiş ülkelerde), ve tüm hücre tedavi yöntemlerinde benzer olarak bunları kullanan ürünlerin ticarileştirilmesi oldukça zor görülmektedir. Bu kısıtlamalar yeni bir yaklaşımı gündeme getirmiştir. Bu yaklaşımda doku iskelelerinin osteojenik potansiyeli olan ajanlar ile (örneğin büyüme faktörleri) yüklenmesi ve bu modifiye doku iskelelerinin biyomateryal olarak defekt onarımında kullanılması öngörülmektedir [14, 26]

Sunulan tez kapsamında, damak yarıklarının onarımında kullanılmak üzere farklı rejimlerde iki farklı büyüme faktörü salan biyobozunur doku iskelelerinin geliştirilmesi ve yaratılacak hayvan modellerinde (damak yarıklı sıçanlar) bu materyallerin kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında doku iskelesi üretiminde kullanılacak biyobozunur polimerler ve bunlardan doku iskelesi oluşturma için uygulanacak yöntemler, grubumuzun önceki deneyimlerinden yararlanılarak laktat/ ϵ -kaprolaktonhomo/kopolimerlerinden doku iskeleleri hazırlanması ve yapı karakterizasyonunda kullanılmıştır. Osteoindüktif etkisi olan TGF- β 3 yüklenmiş jelatin filmlerin ve osteokondaktif etkisi olan BMP-2 yüklenmiş jelatin filmlerin poli laktat/ ϵ -kaprolakton homo/kopolimerlerinden hazırlanan gözenekli biyobozunur doku iskelelerine yerleştirilmesi ile bu yeni modifiye materyallerin hazırlanması/uygulanması ve etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Hayvan modellerinde uygulanan bu doku iskelelerinin kemik doku

rejenerasyon kabiliyetleri histolojik, radyolojik, biyokimyasal ve gen ifade düzeyi çalışmalarıyla incelenmiştir.

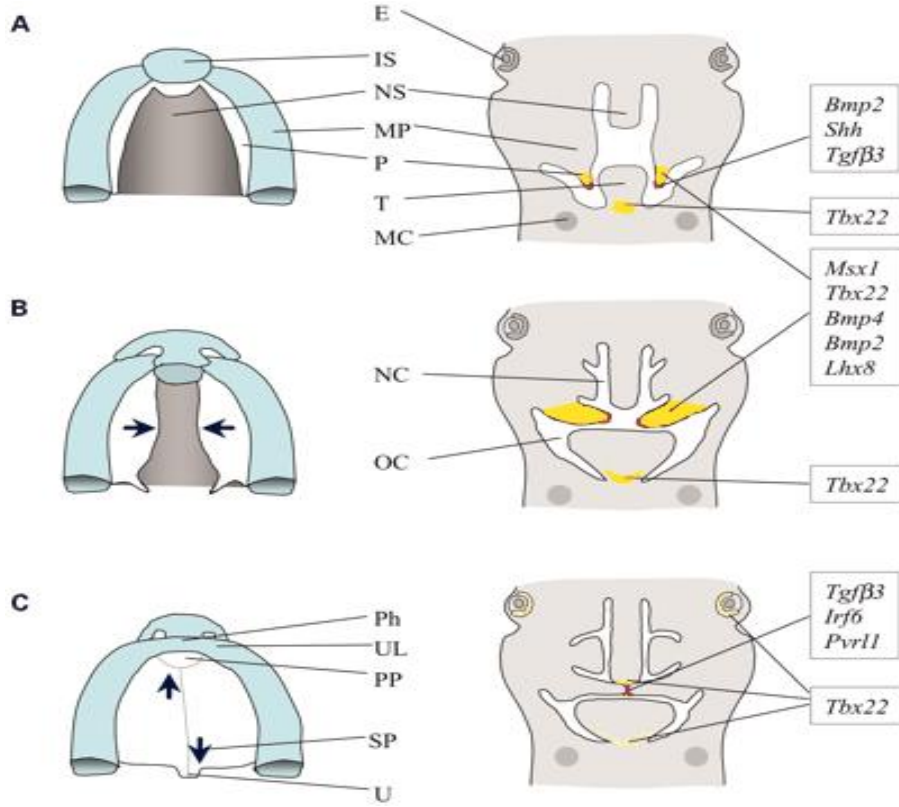
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Damak Yarıkları

Dudak, damak veya alveol kemik defektleri en yaygın olarak karşılaşılan konjenital kraniofasiyal anomaliler arasındadır ve tedavileri için, birbirine göre avantaj ve dezavantajları olan birçok cerrahi yöntem tanımlanmıştır [1, 2]. Damak yarıklarının günümüzdeki tedavi yöntemleri; genel olarak yakınındaki yumuşak dokunun hasarlı bölgeye çevrilmesi ve ikincil olarak yarık hattındaki defektli sert dokunun kansellöz kemik grefti (kalça-ilyak-kemiğinden alınan) ile doldurulması şeklinde özetlenebilen iyi tanımlanmış cerrahi yöntemlerdir. Yumuşak damaktaki anormal yerleşimli kasların onarımı veya birleştirilmesi işlemi (palatoplasti) ile de damağın fonksiyonel/anatomik bütünlüğü sağlanır. Bu işlem sonucunda hastanın beslenmesi ve konuşması doğal seyrine girmektedir. Bu tedavinin çocuğun konuşmaya başladığı 18. aydan önce yapılmış olması dünyaca kabul edilmiş tedavi zamanlamasıdır. Özellikle komplet damak yarıklarında, yumuşak damak defektlerine ek olarak alveolar kemik defektleri de eklenmektedir. Bu kemik defektleri greftler ile onarılmaz kendi haline bırakılırsa sağ-sol alveolar segmentlerin dizilimi bozulmakta çoğu zaman kollabe olmaktadır [3, 4]. Buna bağlı olarak maksilla (orta yüz bölgesini oluşturan kemik) gelişimi ve bütünlüğü bozulduğundan orta yüz hipoplazisi, beraberinde de “Class 3” ağız kapanış bozukluğu oluşmaktadır [5]. Alveolar defektli bu hastalarda ağızdan alınan gıda ve sıvıların burundan geri gelmesi sıkça karşılaşılan bir diğer tatsız durumdur. Alveolar kemik defektlerinin onarılması için iliyak kemikten alınan kansellöz kemik otogreftlerinin kullanılması çoğu cerrahın tercih ettiği bir tekniktir. Böylece aynı seansta hem kemik hem de yumuşak doku defekti onarılmış olmaktadır [6,7]. Eğer alveolar segmentler bu cerrahi işlem sırasında –dizilimi bozuk- ise önce ortodontik tedavi ile dizilim sorunu çözülmek zorundadır. Alveolar kemik defektinin tedavi edilmesinin bir diğer zorunluluğu da buradan çıkacak olan lateral kesici ve kanin dişleri için kemik matriksin gerekliliğidir. Aksi durumda çıkmayan ya da anormal yönelimli anormal dişlerin gelişimi kaçınılmazdır. İliyak kemik greftleri şu sıralı işlemler sonucu alınır; hasta yatar pozisyondayken iliyak kemiğin anterio-süperior kenarına ciltten yapılan insizyon ile ulaşılır. Çevre yumuşak doku, kas ve sinirler korunur/uzaklaştırılır. Dikdörtgen bir kemik kenar kapak gibi kaldırılır. Alttaki iki

korteksli iliyak kemik kanadının ortasındaki kansellöz kemikten küret yardımı ile kansellöz kemik grefti alınır, peşinden greft alıcı yatağa yerleştirilir. Bu greftler sıvı geçirmez şekilde yumuşak doku ile özenle kapatılıp dikilir. Kanama kontrolünden sonra aynı sıra ile donör alan kapatılır, kaldırılan dikdörtgen kemik kapak yerine iade edilir. Tahmin edileceği gibi ağrı, hematom, duyu siniri yaralanması, skar oluşumu ve enfeksiyon gibi olası komplikasyonlar mevcuttur. Bu otogreftler canlı osteoblastları kemik elemanlarını ve mezenşimal hücreleri de içeren üç boyutlu canlı dokular olduğundan osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon potansiyeline sahiptirler. Öte yandan bebek hastada ve sıçanlarda da donör alan sorunu ve yetersizliği aynı ölçüdedir. Tanımlanmış birçok palatogingivoplasti teknikleri mevcuttur. Hangi tekniğin kullanılacağı doğal olarak hastadaki defekte, defekt büyüklüğüne ve eşlik eden anomalilere bağlıdır. Bir diğer faktör de cerrahın hakim olduğu ya da deneyimli olduğu; bir başka deyişle en iyi bildiği teknik olmasına bağlıdır. Halen kullanılmakta olan en yaygın palatoplasti yöntemleri; 1-Von Langenbeck tekniği, 2-Milard tekniği, 3-Veau-Wardill-Kilner pushback tekniği, 4-Furlow double-reversing Z-plasti tekniği, 5-İntravelar veloplasti, uvuler yer değiştirme teknikleri sayılabilir [8]. Ameliyat sonrası flep ayrılması, fistül oluşumu gibi önemli komplikasyonlar gözlenmektedir. Yarık genişliği fistül oluşumunda önemli etkindir, birincil damak veya daha fazla ikincil damakla ilgili yarıklar daha yüksek fistül oranlarına sahiptirler. Uzun dönem palatoplasti komplikasyonları olarak, velofaringeal yetersizlik ve/veya orta yüz yetersizliği ile kapanış bozuklukları sayılabilir. Uygulanan yöntem ve cerrahın deneyimi, komplikasyonların sıklığını ve derecesini önemli oranda etkiler [27].

Hastanın uygun bir verici (donör) bölgesinden alınan otogreftlerin damak yarıklarında oldukça başarılı bir şekilde kullanıldıklarını söylemek mümkündür [11]. Greftin başarılı olmasında hem greftteki hem de yarığı çevreleyen alveolar kemikteki osteojenik faktörlerin, ekstrasellüler kemik matriks proteinlerinin, mezenşimal hücrelerin, çeşitli büyüme faktörlerinin etkili olduğu söylenebilir. Bunların yarattığı osteoindüktif ve osteokondüktif etki ile hem otogreftin çevre kemiğe entegrasyonunu hem de yeni kemik dokusunun oluşumunun gerçekleştiği ifade edilmektedir. Şekil 2.1'de primer ve sekonder kemik gelişimi ve bu süreçte etkili olan genler gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Primer ve sekonder damak gelişimi ve etkin olan genler, A. Damak oluşumunun başlangıcı (E: Göz, NS: Nazal septum, MP: Maksiller prosesler, P: Palatal çıkıntılar, T: Dil) B. Maksiller hücre hareketleri (NC: Nazal boşluk, OC: Oral boşluk) C. Primer ve sekonder damak oluşumunun tamamlanması (Ph: Filtrum, UL: Üst dudak, PP: Primer damak, SP: Sekonder damak; U: Uvula) [155]

En sık greft alınan bölge olan iliyak kanata ait morbiditelerle sık olarak karşılaştırılmaktadır. Majör komplikasyonlar %8,6,minör komplikasyonlar ise %20,6 olarak rapor edilmiştir.

2.2 Greftler

Günümüzde iskelet sistemindeki kemik deformitelerinin rekonstrüksiyonunu gerektiren travma, kemik enfeksiyonları, konjenital anomaliler, kas iskelet sistemi tümör cerrahileri, revizyonartroplasti cerrahiler ve spinal cerrahiler sırasında oluşan kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla sentetik veya doğal kaynaklı birçok farklı malzeme kullanılmaktadır. Greft uygulamalarında transplante edilen materyaller immünolojik orjinlerine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır [28].

Kemik grefti olarak otogreftler ve allogreftler kullanılır. Kemik yerine geçebilecek maddeler arasında ise seramikler (doğal ve sentetik), demineralize kemik matriksi, BMP (kemik morfojenik protein), otolog kemik iliği, büyüme faktörleri ve kompozit greftler tercih edilebilir.

2.2.1 Otolog Kemik Greftleri (Otogreftler)

Otogreftler aynı canlıdan alınan dokulardır. İlk kez Bränemark ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır [29]. İskelet sisteminde oluşan deformitelerin tedavisinde kullanılan bu otolog kemik greftlerinin kansellöz, damarlı (vaskülarize) olmayan kortikal, damarlı kortikal ve kemik iliği şeklinde kullanımları mevcuttur. Otogreftlerin osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri farklılık gösterir [30].

2.2.1.1 Otolog Kansellöz Kemik Greftleri

Spinal füzyon, kemik kayıplarının doldurulması ve kırık tedavisinde en sık kullanılan greftler, otolog kansellöz kemik greftleridir. Otojen kansellöz kemik naklinde bu greftin içinde osteojenik kemik ve kemik iliği hücreleri, osteokondüktif kollajen ve mineral matriksi, matriks proteinleri ve osteoindüktif matriks proteinlerinde hasarlı bölgeye nakli gerçekleşir.

Burwell 1960'lı yıllarda yaptığı çalışmalarda, otogreft yerleştirilen bölgede oluşan yeni kemik dokusunda primitif osteojenik hücrelerin osteoblastlara dönüştüğünü göstermiştir [31].

2.2.1.2 Kortikal Kemik Ototogreftleri

Kortikal kemik greftlerinin biyouyumlulukları, otojen kansellöz kemik greftlerine göre daha az başarı gösterirler. Kortikal kemiğin porozitesinin az olması greftin damarlanmasını negatif yönde etkiler. Kortikal kemiğin içerdiği osteoblastik progenitor hücre sayısı, trabeküler kemiğe göre daha azdır. Kortikal kemikteki hücreler, oksijen difüzyonu ve besin aktarımının az olması nedeniyle nakledilmeye daha az dirençlidir. Kortikal kemik greftleri dayanıklı olmayan büyük kemik kayıplarının doldurulmasında avantaj sağlar [32].

2.2.1.3 Kansellöz Kemik Ototogreftleri

Damarlı olmayan otogreftlerde görülen rezorbsiyon, osteokondüksiyon ve remodelasyon gelişmemesi sebebiyle damarlı olmayan otogreftlere göre ilk haftalarda daha dayanıklıdır. Bu greftler, yapısal bütünlüklerini kaybetmeden inkorpore olur ve nakledildikleri alanın mekanik özellikleri ve Wolf kanunları doğrultusunda hipertrofiye olurlar.

2.2.1.4 Kemik İliği

Kemik iliğinin greft olarak kullanımında osteojenik özelliğinden faydalanılır. Sahip oldukları canlı hücrelere osteoblastlara dönüşme eğilimi gösterirler. Bu grubun tek dezavantajı mekanik olarak bir destek sağlayamamalarıdır.

2.2.2 Allojen Kemik Greftleri (Allogreftler)

Aynı canlı türünden alınan fakat alıcıyla hiçbir genetik benzerlik taşımayan greftlerdir. Allogreftlerin immunolojik yanıtları sebebiyle yaygın olmayan kullanımları II. Dünya savaşı sırasında artmıştır. Dondurulmuş kurutulmuş veya dondurulmuş formları mevcuttur. Poroz yapıya sahiptirler. Bu yapılarında progenitor hücreleri ve endotelial hücreleri barındırırlar. Matrikslerinde büyüme faktörlerini ve az miktarda kemik morfojenik proteinleri içerirler. Allojen kemik hazırlanması ve sterilizasyonu sırasında yapılan işlemler, kemiğin immunojenik etkilerini azaltırken, osteoindüktivite, osteokondüktivite ve mekanik özellikleri üzerinde de etkilidir [30].

2.2.3 Ksenojenik Kemik Greftleri (Xenogrefler)

Alıcıdan farklı türde bir vericiden elde edilen greftlerdir. Diğer greft çeşitleriyle kıyaslandığında bu materyallerin erken dönem klinik uygulamaları normal iyileşme sürecini yavaşlatmaktadır. Bu sınıfta dana kemiği en yaygın olarak kullanılan greft kaynağıdır. Hazırlanma aşamasında kullanılan organik çözücüler greftin immünojenitesinin çoğunu kaybetmesine sebep olur [28].

2.2.4 İzogen Kemik Greftleri

Tek yumurta ikizlerinden transplante edilen dokulara verilen isimdir [30].

2.3 Kemik Dokusu

Kemik, insan vücudunda biyomekanik ve mekanik özellikleri sayesinde yapı materyeli olarak iş görür. Buna bağlı olarak bazı görevleri vardır. Bunları şu şekilde sıralamak mümkündür: İskeleti oluşturur, kafatası ve göğüste bulunan beyin, akciğer ve kalp gibi yaşamsal organları korur ve onlara desteklik sağlar, genellikle uzun kemiklerde bulunan kemik iliği kan hücrelerini meydana getirir, iskelet kaslarının kemiklere bağlı olmaları ve kasılmaları ile vücut hareketlerini sağlar, vücutta kalsiyum deposu durumundadır [33- 35]. Kemik aynı zamanda kendisini yapısal olarak tamir edebilen, mineral depolama özelliği sayesinde hücre dışı sıvı dengesinin korunmasında rol oynayan bir yapıya sahiptir [36- 39].

Kemik dokusu hücreler arası en çok sertleşmiş olan dokudur. Bütün kemikler iç yüzeylerde endosteum ve dış yüzeylerde de periosteum adı verilen osteojenik hücrelere sahip zarlar ile örtülüdür [40]. Kemiğin kimyasal düzeni, vücudumuzda büyük oranda aynıdır. Vücut ağırlığımızın %30'u organik madde, %45'i inorganik madde ve %25'i sudan oluşmuştur [41]. Kemik dokusu, kemik matriksi ve çeşitli kemik hücrelerinden (osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar olmak üzere dört tip) meydana gelmiştir.

Kemik dokusunun matriks kısmı organik matriks ve inorganik matriks olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Her iki bölümde de kemiğin fiziksel özellikleri önemlidir [42].

Kemiğin organik matriksine osteoid madde denir. Kemik matriksinin organik kısmının %95 kadarını kollajen tip I lifleri, geri kalan kısmını ise şekilsiz zemin

maddesi oluşturmaktadır. Şekilsiz zemin maddesi içinde proteinlere bağlı olarak glikozaminoglikanlar bulunmaktadır. Spesifik bir glikoprotein olan osteomükoid buna örnek olarak verilebilir. Bu proteinler içinde tirozin ve leusin amino asitleri bol, prolin ve glisin az, hidroksiprolin yoktur. Bağ doku kollajeninden farkı da budur. Kemiğin organik matriksinden izole edilen iyi bilinen diğer iki önemli protein osteokalsin ve sialoprotein' dir. Bu iki protein gama-karboksiglutamik asitler içerir ve bunlar Ca^{2+} iyonlarını bağlayarak kemik matriksinin kalsifikasyonunu sağlar. Glikozaminoglikanlardan özellikle kondriotin-4-sülfat (kondriotin-A), kondriotin-6-sülfat (kondriotin-C) ve keratan sülfat dominant olarak bulunur [35]. Kemiğin organik yapısını büyük oranda oluşturan kollajen liflerin sentezi mezenkimal orjinli osteoblastlardan meydana gelir. Osteoblastlar bir süre sonra, kendi oluşturdukları kemik matriksi tarafından sarılarak osteosit adını alırlar. Bu hücreler, artık devamlı kemik oluşturma yeteneklerini kaybetmişlerdir. Kemikte bulunan diğer büyük tip hücreler, çok çekirdekli osteoklastlardır. Bu hücreler, kemiğin sürekli şekil değiştirme (remodelling) işleminin bir parçası olan, kemik rezorpsiyonu ile ilgilidirler.

Kemiğin inorganik matriksi kemik kuru ağırlığının %65'i kadardır. İnorganik maddeler içinde kalsiyum ve fosfat tuzları büyük oranda daha sonra bikarbonat ve sitrat tuzları gelir. Ayrıca magnezyum, potasyum, sodyum gibi elementlerin tuzları da bol olarak bulunur. Kalsiyum ve fosfatın bikarbonat ve hidroksiapatit kristalleri yaygındır ve hidroksiapatit kristalleri $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ tipik kristaller şeklindedir. İğne veya uzun kristaller şeklindeki hidroksiapatitler kollajen lifleri yanında uzanır. Bu kristallerin etrafı amorf bir madde ile sarılmıştır. Kristalin çevresindeki iyonlar hidratlar şeklindedir. Böylece kristal etrafında bir su tabakası var demektir. Bu tabaka sayesinde kristal kolayca büyür veya küçülür. Diğer bir ifadeyle kristal ile vücut sıvısı arasında iyon alış verişi kolayca sağlanmaktadır. İnorganik materyalde %99 Ca, %50 Mg, %35 Na, %4 K iyonları bulunur [35,40]. Kemik inorganik fazın, organik matrikse göre olan oranı kemiğin cinsine ve yaşına bağlıdır. Mineral matriks oluşumu organik matriks oluşumundan kısa bir süre sonra %90 oranında gerçekleşir. Kalan %10'u dokunun iyonlara geçirgenliğinin azalması nedeniyle yavaş çökeler. Yaşlanmaya bağlı olarak mineral matriksin bileşimi değişir; kalsiyum ve karbonat oranı artar, fosfat, magnezyum ve su oranı azalır. Fosfat yerine karbonat tutulması nedeniyle Ca/P oranı giderek yükselir. Mineral matriksin

organik matrikse oranı ve bileşimi bazı patolojik nedenlere bağlı olarak da değişir. Raşitizm veya osteomalasiye mineral matriks oranı %35'e iner; kalsiyum oranı düşer, magnezyum oranı yükselir [41]. Kemik, minerallerin statik bir deposu değildir. Osteoblastik ve osteoklastik bir aktivite ile kemik bileşiminin sabitliği, dinamik bir denge halinde sürdürülür. Kemiğin bu sürekli yeniden sentezlenmesi ve rezorpsiyonu hayat boyunca devam eder. Kemiğin büyümesi kesildikten sonra da uzun süre devam eder. Bu durum kemiğin yeniden şekillenmesi (remodelling) olarak adlandırılır. Normal durumlarda kemik oluşumu ve rezorpsiyonu sıkı bir şekilde bağlantılıdır [43].

Kemik dokusunun diğer elemanları osteoprogenitor, osteoblast, osteosit ve osteoklastlar olmak üzere kemik hücreleridir. İlk üç hücre kemik yapımı ile görevlidirler. Bunlar arasında transformasyon görülür. Diğer bir deyişle bu hücreler gerektiğinde birbirlerine dönüşebilirler. Dördüncü tip hücre ise orijin olarak farklı olup kemik yıkımı ile görevli olup kemiğin gerektiğinde yeni şeklinin oluşmasında görev yaparlar. Osteoklastlar mononükleer fagosit sistem hücrelerindedir [35]. Şekil 2.2'de kemik hücreleri gösterilmektedir.

Osteoprogenitor hücreler genellikle istirahat halindedir veya uyarılma ile osteoblastlara dönüşerek kemik matriksinin sentezlenmesini sağlarlar. Bu hücreler genellikle normal büyüme sırasında ve erginde kemiğin şekil değiştirdiği durumlarda aktifleşirler. Bunlar kemik yüzeyinde özellikle periosteumun iç yüzeyinde, endosteumun altında ve Volkmann kanalları ile Havers kanalları için döşeyen endosteumda bulunurlar. Erginde kemiğin şekil değiştirdiği durumlarda osteoblastları oluştururlar. Osteoprogenitor hücreler diğer dokulardaki farklılaşmamış mezenşim hücrelere karşılık olan hücreler olup ikiye bölünür ve çoğalırlar. Bölünüp çoğalırken osteoblast ve osteoklastlara dönüşürler. Bu hücrelerin yağ hücresi, fibroblast ve kemik iliğindeki kan yapıcı hücrelere dönüşebildiği de gösterilmiştir [44]. Fakat bu hücreler kemik hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşmamış hücrelerdir. Osteoprogenitor hücreler istirahat halinde yassı, sitoplazmaları asidofilik bazen bazofiliktir. Çekirdekleri yassı ve oval şekillidir. Granüllü endoplazmik retikulumları, serbest ribozomları ve küçük golgileri bulunmaktadır. Osteoprogenitor hücrelerin farklılaşma durumları tam kesinlik kazanmamakla birlikte mezenşim hücrelerinden farklılaşmışlardır.

Osteoblastlar matriksi sentezledikleri için kemik yapımı hücreleridir. Matriksin kollajen tipli liflerini ve glikozaminoglikan kısmını sentezler. Diğer bir ifadeyle kemik dokusunun organik kısmını sentezlerler. Yeni sentezlenmiş bu organik kısımda henüz mineral birikimi oluşmadığı için sertleşmemiştir. Hücrelerin hemen etrafındaki bu kısma osteoid denir. Osteoblastlar aynı zamanda matriksin kireçleşmesi (kalsifikasyonu) ile ilgilidir. Kireçlenme olayı osteoblastların çapı 50-250 nm kadar olan zarlı küçük kesecikler halinde salgılanmaya başlaması ile başlar. Bu kesecikler alkalin fosfataz enzimi bakımından zengindir. Osteoblastlar ışık mikroskopunda kemik oluşumu yerlerinde tek sıralı olarak yer alan kübik veya poligonal şekilli hücreler olmalarıyla kolayca tanınırlar. Sentezledikleri matriksin mineralleşmesi henüz olmadığı için eosinle koyu boyanırlar. Osteoblastların sitoplazmaları tüm organeller bakımından gelişmiştir. Sitoplazmada alkalin fosfataz bakımından zengin granüller bulunmaktadır. Bu hücreler elektron mikroskopunda incelendiği zaman hücreler arası sıkı bağlantı bölgeleri olduğu görülür. Bu bağlantılar matriksin mineralleştiği durumlarda hücreler arası ilişkiyi sağlamak için hazırlık durumudur. Osteoblastlar osteojenik özelliktedir. Kemik dokusunun yüzeyindeki boşlukları döşer [41,35].

Osteositler kemiğin olgun hücre tipleridir. Dokuda matriksle sarılmış durumdadırlar. Osteoblastların transformasyonu ile meydana gelmiş hücrelerdir. Kemik dokusu yapısının korunması ile görevlidirler. Işık mikroskopunda yıldız gibi uzantıları olan ve halkasal olarak sıralanmış olarak görünürler. Mineralleşmiş matriks arasında ince kanalcıklarla birbirleriyle bağlantılar (anastomozlar) yapmışlardır. Osteositlerde osteoblastlar gibi matriksin kollajen tip I liflerini ve glikozaminoglikanlarını sentezler. Bazı araştırmacılara göre osteositik osteolizis ile de kemik doku erimesi yapılmakta olup kalsiyum iyonları plazmaya verilmektedir. Osteositlerin ölümünün ardından matriks rezorpsiyonu oluşur [38, 44, 35].

Osteoklastlar büyük ve çok çekirdekli hücrelerdir. Bunların görevi kemik yıkımı yaparak kemik dokuda yeni boşluklar meydana getirmektedir. Genellikle yüzeyde yer alan bu hücrelerin açmış oldukları boşluklara Howship lakünleri veya erime bölgeleri denir. Eosinifilik hücreler olan osteoklastlar asit fosfatazın kuvvetli reaksiyon göstermelerinden dolayı çok sayıda lizozomlara sahip olduğu anlaşılır. Bu hücrelerin bazı kenarlarında mikrovillus gibi çok sayıda sitoplazmik zar

geldiği an başlar ve kırık uçları birleşinceye kadar süregelir. Bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamış iki şekilde incelenir:

1-Primer Kırık İyileşmesi

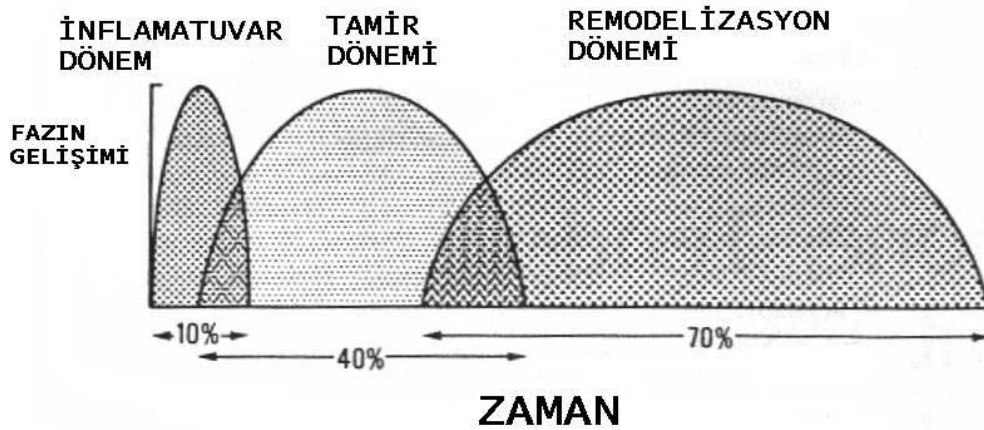
2-Sekonder Kırık İyileşmesi

2.3.1.1 Primer Kırık İyileşmesi

Genellikle süngerimsi kemikte görülür. Dış kallus oluşumu gözlenmeden, sadece iç kallus oluşumuyla seyreden temas iyileşmesi şeklindedir. Kallus radyolojik olarak gözlenemez. Osteoklastlar kırık uçlarındaki nekrozu, rezorbe eder. İlerleyen evrede osteoblastlar yeni kemik yapısını meydana getirirler. Kırıkta oluşum sürecinde gözlenemez.

2.3.1.2 Sekonder Kırık İyileşmesi

İndirek kemik iyileşmesi veya periosteal - endosteal kallus ile non-osteonal iyileşme olarak da isimlendirilebilir. Sekonder kemik iyileşmesini 3 evrede izleyebilmek mümkündür. Bunlar; inflamatuvar dönemi, tamir dönemi ve remodelizasyon dönemidir [45]. Şekil 2.3'te kemik iyileşmesi dönemleri gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Kırık iyileşmesi dönemleri [46].

İnflamatuvar (Hematom, Yanğı) Dönem (1–4 gün):

Doku travmalarında olduğu gibi, kırıklarda da dokunun ilk cevabı "inflamasyon" yani "yanğı"dır. Bu dönem ilk 3–4 günlük süreyi kapsar. Bu evrede hematom ve

hücre ölümü enflamasyonu başlatır. Kırığın etrafına toplanan kan ve lenf sıvısına kırık hematoma denir. Hematom uyguladığı basınçla kırık uçlarını bir arada tutar. Kırık hematoma ortamında bulunan trombositler ve ortamdaki diğer hücreler epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombositlerden üretilmiş büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), kemikten türetilmiş büyüme faktörü (BDGF), interlekin-1 (IL-1) gibi proteinleri ortama salarlar [47]. Bu proteinlerin periosteal hücre çoğalması, doku onarımı ve matriks sentezi gibi görevleri vardır.

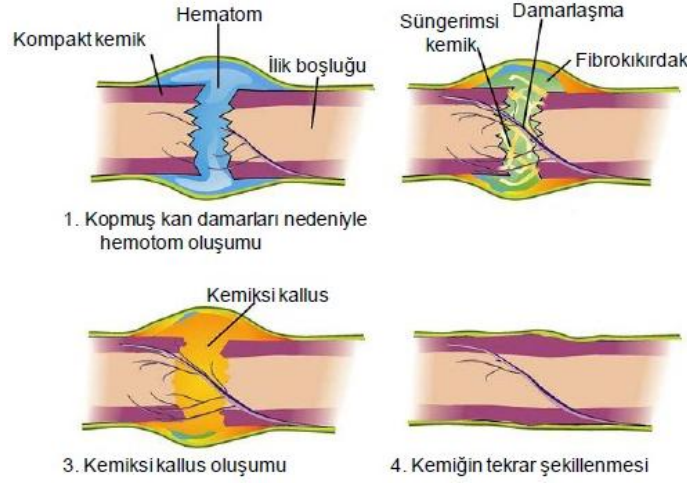
Onarım (Reperasyon) Dönemi (2- 40 gün):

Bu evrede nekrotik dokuları rezorbe edilir ve fibroblastların bölgeye göç etmesiyle onarım evresi başlar. Onarım döneminde görev alan hücreler mezanşimal kökenli, çok yönlü gelişim gücüne sahip olan (pluripotent) hücrelerdir. Osteoklastlar ölü kemik dokusunu kaldırırken osteoblastlara farklılaşma kemiğe yakın bölgelerde ilk olarak gözlemlenir. Kırık uçlarına yakın bölgelerde dış kallus oluşumu meydana gelir. Bu evre fibröz kallus dönemi olarak adlandırılır. Osteoblastlar kallus içinde kemiğin oluşabileceği matriks ortamını sentezlerler. Fibröz kallus dönemini kırıkta yapımının ortama hâkim olmasıyla kırıkta kallus dönemi izler.

Mineralizasyon(kalsifikasyon) evresinde ALP kalsiyumu çöktürür [48, 49]. Osteoklastların geri emilimle boşalttığı alanlar osteoblastlar tarafından sarılarak kemik oluşumu başlatılır. Bu evreden sonra sert kallus oluşumu başlar.

Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi:

Bu evre en uzun evredir. Osteoklastik faaliyetle rezorbsiyon devam ederken, osteoblastlar yeni kemik oluşumunu sağlamaktadır. Bir önceki evrede kalsifiye olan kırıkta osteoid dokuyla yer değişir. Kallus endokondral kemik oluşum yoluyla örgü kemik ile yer değiştirir. Örgü kemik ağır ağır rezorbe olur ve lameller kemik ile yer değiştirir. Şekil 2.4'te kemik onarımı aşamalarına ait şekil verilmiştir.



Şekil 2.4 Kemik onarımı

2.3.2 Kemik Belirteçleri

Alkalen Fosfataz (ALP):

Alkalen fosfataz bütün hücre tiplerinde bulunabilen hücresel bir proteindir. Bu nedenle kemiğe özgü değildir. ALP'nin bu farklı tipleri barsak, plasenta, kemik, karaciğer ve böbrekten köken almaktadır. Bu izoenzimler arasındaki fark yapılarında bulunan siyalik asitin değişik oranlarda bulunmasıdır. ALP substrattaki fosfat gruplarını kaldıran bir hidrolaz enzimi olarak iş görmektedir. Farklı hücre tiplerinin proliferasyonunda görev almaktadır. Birçok çalışma ALP'nin hücresel aktivitenin ve farklılaşmanın erken belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda protein düzeyinin mekanik güç uygulamalarında da yükseldiği gösterilmiştir [50- 60].

ALP'nin izoformlarından biri olan kemik alkalın fosfatı (BALP) osteoblastlar tarafından üretilir. Osteoblast membranına yerleşik olan bu protein osteoblast aktivasyonunun olması durumunda dolaşıma salınır. Bu nedenle kemik döngüsünün en önemli belirteçleridir.

2.3.2.1 Transkripsiyon Faktörleri

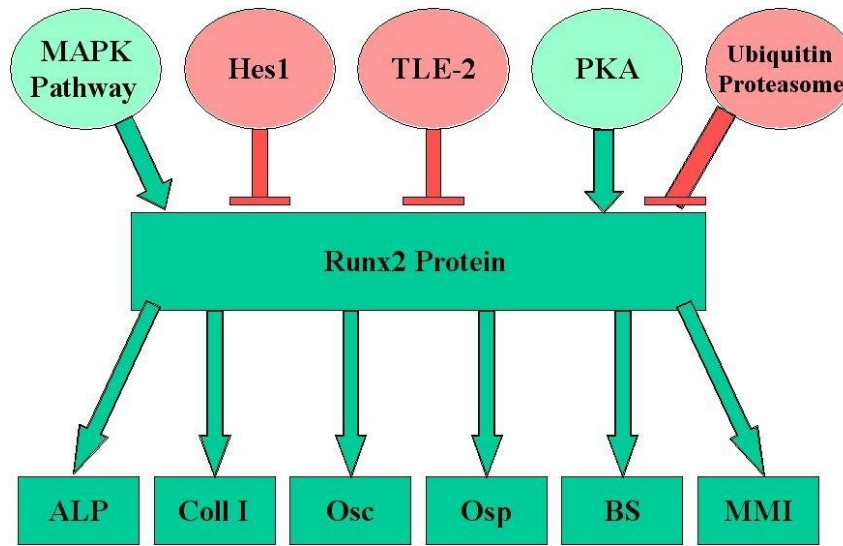
Transkripsiyon faktörleri, DNA'nın üzerindeki şifreyi protein sentezine götüreceği yol olan transkripsiyon basamağını, DNA üzerindeki belirli bölgelere bağlanarak,

tek başlarına ya da başka proteinlerle birlikte kolaylaştırılan veya engelleyen proteinlerdir.

Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx 2):

Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2, (Cbfa 1/PEBP2Aa/AML-3/Osf2)) osteoblast fenotiplenmesindeki en önemli gen olarak tanımlanır [61]. Birçok çalışma memeli organizmaların iskelet gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Yapılan ilk çalışmalarda Runx2'nin osteokalsinleri düzenlendiği görülmüştür. Fakat son dönemlerde yapılan araştırmalar geniş bir spektrumda osteoblastlara özgü genleri düzenlediğini göstermiştir. Runx2 transkripti birçok osteogenik sinyal yolağını etkileyebilmektedir. Bu yeteneği sayesinde osteokalsin, osteopontin, kollajen 1, kollajenaz 3 (matriks metaloproteinaz 1), kemik siyaloproteini, alkaline fosfataz TGFβ reseptör 1, RANKL (nükleer faktör kappa b ligandı reseptör aktivatörü) gibi genleri direkt uyarabilmektedir (Şekil 2.5) [1,62-66].



Şekil 2.5 Runx2'nin regülasyonu ve etkilediği yollar. Up regülatör etkiye sahip olanlar yeşille gösterilirken, inhibitör etkiye sahip olanlar kırmızı ile gösterilmiştir.

2.3.2.2 Matriks Proteinleri

Kemiğin organik matriksine osteoid madde adı verilir. Osteoid madde erişkinlerde kemik ağırlığının % 25'ini, hacim olarak da % 38'ini oluşturur. Organik maddelerin %95'i kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşmaktadır.

Kemik Siyaloproteini (BSP):

Yapısında yüksek oranda siyalik asit içeren, kemiğin non-kollajen matriksinde bulunan glikopeptit yapısında 70-80 kDa ağırlığındaki yapı elemanıdır. Esnek yapısı nedeniyle hidrofobik kollajen bağlanma bölgeleri içeren birkaç yapısal bölgesi vardır. Osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sentezlenir. Kemik formasyonunu sağlayan osteoblastlar tarafından BSP geninin ifadenmesi hormonlar ve sitokinler tarafından artırılır. BSP kemik formasyonunda, mineralize olmuş dokuların ekstrasellüler matrikslerinin organizasyonunda ve matriks adezyonunda büyük role sahiptir.

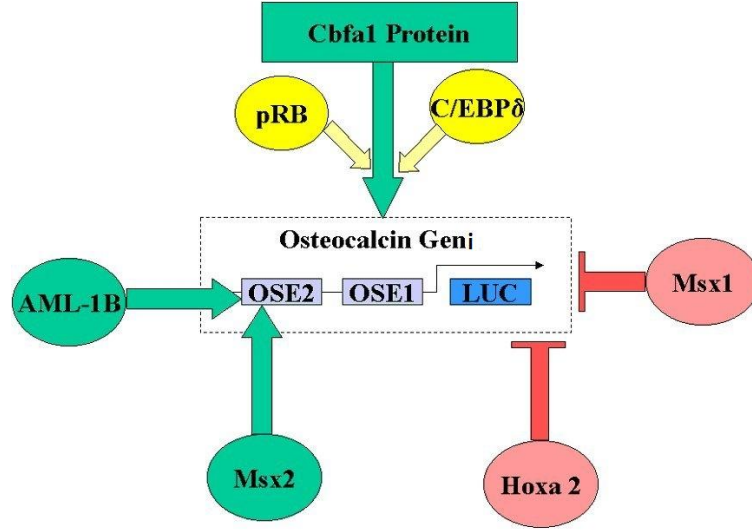
Kollajen 1 (COL1):

Tip I kollajen, kollajenin öncül formudur. Hücre yüzeyindeki sitokinlerle diğer ekstrasellüler matriks proteinleri arasındaki bağlantıları biçimlendirirler. Deri, diş, kornea, damarlar ve tendonlar gibi birçok hücre tipinde tayin edildiği için kemiğe özgü olarak kabul edilmez. Bu protein hücre adezyonunda, proliferasyonunda ve osteoblastların fenotiplerinin farklılaşmasında görev alır. Kollajen I'in ifadenmesinin mekanik güç uygulamalarından 2 gün sonra arttığını gösteren çalışmalar vardır [67, 68]. Bu nedenle osteoblastik farklılaşmada erken belirteç olarak görev aldığı gözlemlenmiştir. Osteoblastların tip I kollajen sentezinde amino (-N) ve karboksi (-C) propeptidleri ekstrasellüler endopeptidazlar tarafından koparılmaktadır. Serum tip I kollajen karboksiterminal propeptid (PICP) ve amino-terminal propeptid (PINP) düzeyleri, kemikte osteoblastlar ve bağ dokusundaki fibroblastlarda sentezlenen yeni kollajen sentezindeki değişiklikleri gösterir [69-70].

Osteokalsin [OC (Kemik gla Proteini)]:

Kemik gla proteini olarak da bilinen osteokalsin kemiğe özgü nadir proteinlerden biridir [71]. 48 aminoasitten oluşur ve 5.8 kDa ağırlığındadır. Hidroksiapatit bağlama yeteneğindedir. OC'nin başlıca özelliklerinden biri vitamin-K bağımlı, gamma karboksiglutamik asit (Gla) kısımlarının kalsiyum bağlamasıdır. Kemiğin non-kollajen kısmının bir elemanıdır. Osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilirler [72- 73]. Osteoblast progenitör hücrelerin farklılaşmasında, kemiğin biçimlenme aşamasında matriks sentezi ve

mineralizasyonunda büyük rol oynarlar [74]. Bu gen birçok hücre içi faktör ve çeşitli reseptör bağlanma bölgeleri sayesinde de farklı hormonlar tarafından düzenlenir [61]. Genin yüksek düzeylerde ifadenmesi Runx2 proteini tarafından düzenlenir. OC'nin regülasyonu Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

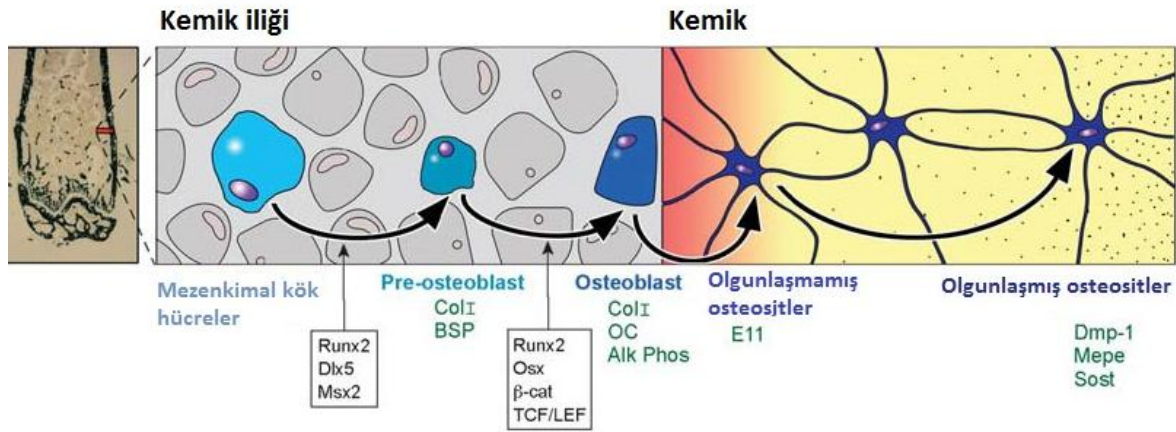


Şekil 2.6 OC'nin regülasyonu. Up regülatör etkiye sahip olanlar yeşille gösterilirken, inhibitör etkiye sahip olanlar kırmızı ile, bağlanan partner proteinler sarı ile gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, OC'nin kemik formasyonu sırasında sentezlendiğini gösterirken, resorpsiyon aşamasında yıkıldığını göstermiştir. Bu sebeple OC'nin kemik matris metabolizmasını yoksa kemik döngüsünün mü belirleyicisi olduğu tam olarak açık değildir [74].

Osteonektin (SPARC):

SPARC (Osteonektin, BM-40) 32kD ağırlığında, asidik ve sisteince zengin glikoprotein yapısında kalsiyum bağlayan bir matris proteindir. Bu proteinler ECM'in yapısal elemanları olarak iş görmekten çok hücre-matris iletişimini sağlarlar [75]. Ekstrasellüler matris destek sağlayan hidroksiapatite ve katyonlara yüksek ilgisi vardır [76]. SPARC kemik formasyonu ve resorpsiyonu arasında bir denge sağlar. Şekil 2.7'de yeni kemik oluşumu süresince rol oynayan moleküler düzenleyiciler gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Kemik oluşumunun moleküler düzenleyicileri [77].

2.4 Doku Mühendisliği

Langer ve Vacanti doku mühendisliğini doku fonksiyonunu yenileyen, devam ettiren veya geliştiren biyolojik maddelerin geliştirilmesi için mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini uygulayan disiplinler arası bir araştırma sahası olarak tanımlamıştır [78]. Doku mühendisliği, özgün hücrelerin biyopsi yoluyla hastadan alınarak, kontrollü kültür ortamlarında, biyomimetik özellik gösteren iskelet yapılar (scaffold) üzerinde üretilmesi ve elde edilen bu yapının hastadaki hasarlı bölgeye yerleştirilerek yeni doku oluşumunun gerçekleştirilmesi fikrine dayanmaktadır [79].

Hücrelerin modern tıpta; hastalık, onarım ve rejenerasyonda dokular için terapötik ajanlar olarak kullanımı en zor ve karmaşık konulardan biridir. Doku mühendisliği, zarar görmüş doku ya da organların tedavisi için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için büyük potansiyeli olan çok farklı disiplinleri bir araya getiren yeni bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır [80]. İlk başta kaza sonucu yaralanmalar olmak üzere, kanser gibi hastalıkların ya da doğum sonrası anomalilerinin cerrahi işlemlerle kaybedilen organ ya da dokuların organ veya doku nakliyle tedavi edilmesi oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Cerrahi bir operasyonla alınan dokuların hastadaki yaralı bölgeye nakli başarılı sonuçlar veren bir tedavi yöntemi olsa da her dokunun nakli mümkün değildir. Ayrıca operasyonda enfeksiyon riskinin yüksek olması bu yöntemi sınırlandırmaktadır. Bu yöntemde kullanılabilecek alternatif doku kaynakları diğer insanlardan alınan dokular (allogreft) olabildiği gibi bazı hayvanlardan alınan dokular (ksenogreft) ya da organlar da olabilmektedir. Fakat bu kaynakların kullanımında implantasyon

sonrası meydana gelebilecek immünolojik etkilerin ve donör organ bulunmasının zorluğu sorun teşkil etmektedir [81].

1990'lı yıllarda doku mühendisliğinde büyük gelişmeler olmuş ve şu ana kadar aktif araştırma kapsamından çıkarılan bir doku ya da organ olmamıştır. Bununla birlikte eklem hasarlarının tamiri için aralarında deri ve kıkırdağın olduğu yalnızca birkaç ürün klinik denemelere alınmıştır. 1933 yılında Bisceglie'nin, bir polimer membran içerisine yerleştirdiği fare tümör hücrelerini, tavuk embriyolarının abdominal boşluğuna yerleştirmesi ve sonrasında bu hücrelerin yaşamaya devam ettiğini göstermesi doku mühendisliğinin ilk örnekleri arasında verilebilir [82]. Son yıllarda, mühendislik ve yaşam bilimlerinde kullanılan yöntemleri bir araya getirerek uygulayan doku mühendisliği yaklaşımı, doku yenilenmesi için yapay sistemlerin oluşturularak yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi umudunu açığa çıkarmış ve çok sayıda bilim adamının ilgisini çekmiştir [83].

Klasik doku mühendisliği yaklaşımında organların ya da dokuların başarılı bir şekilde rejenerasyonunda üç temel öge bulunmaktadır. Bunlardan ilki doku oluşumunu sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler doku oluşumu süresince etraflarında depolanan hücre dışı matrikste bulunurlar. Dokunun yapısı ve fonksiyonunun devamlılığı için hücre dışı matriks önemli bir rol oynar. Bu nedenle doku mühendisliğinde hücre dışı matriksi taklit eden yapılar meydana getirmek temel hedeflerden biridir. İşte bu nedenle doku mühendisliği yaklaşımındaki ikinci önemli faktör hücre dışı matriksi taklit ederek, hücrelere yapısal destek sağlayarak, hücrelerin yapışmasını ve üremesini sağlayacak doku iskelesidir [84]. Bu yapının gözenekli, biyouyumlu, bozunabilir özellikte olması gerekir. Böylece hücrelerin göçü ve içe doğru büyümeleri için destekleyici zemin sağlanır [85]. Doku mühendisliği yaklaşımında son önemli öge biyosinyal molekülleridir. Biyosinyal molekülleri, biyomalzeme-hücre etkileşimleri ve bu etkileşimlerin kontrol edilmesini sağlayan hücre yapışma ve büyüme faktörleridir. Bu moleküller implant bölgesine çevre hücrelerin göçünü, orada çoğalmasını veya farklılaşmasını uyarırlar ve transplantasyondan önce doku iskelelerine kovalent ya da kovalent olmayan güçler ile birleşir ve ya immobilize edilebilirler [85].

Doku mühendisliği çalışmaları birçok farklı konuda yürütülmektedir. Deri, kemik, kıkırdak, sinir ve kan damarları bu çalışmalara örnek olarak verilebilir. Bunlardan

kemik doku mühendisliğinde diğer doku mühendisliklerinde de olduğu gibi gelecek vadeden, doku iskeleleri, hücreler, belirli biyosinyal moleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan üç boyutlu yaşayan hücresel yapıların tasarımıdır.

2.5 Kemik Doku Mühendisliği

Kemik defektleri doğumdan gelen anomaliler, travma, konjenital deformasyonlar ya da konjenital patolojik deformasyonlar gibi çeşitli nedenlerle oluşabilir [86]. Kemik dokusu kendini yenileme yeteneğine sahip olsa da, kritik boyutun üzerindeki hasarların tümüyle iyileşebilmesi mümkün olmamaktadır. Amerika'da her yıl 1,5 milyondan fazla insan kemik cerrahisi operasyonlarına maruz kalmaktadır [87]. Kemik defektlerinin onarılmasında uygulanan cerrahi yaklaşımlar günümüzde biyomalzemelerin kullanımında içermektedir. Kemik doku mühendisliği yardımı ile doku yenilenmesi ile dokunun normal fonksiyonlarını koruyabilmek mümkündür. Bu uygulamalar hasarlı bölgelerin fonksiyonel ve uygulanabilir alternatiflerinin kullanımına izin vermektedir. Biyomalzemeler metaller, polimerler, seramikler and kompozit materyaller olabilir.

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak biyomalzemenin osteokondüktif (kemiğin içe büyümesini etkinleştirme), osteoindüktif (kemik oluşumunu uyarma) özelliklerinin yanında hücre filtrasyonuna izin verecek gözenekli bir yapıya sahip olması beklenir. Ayrıca, biyouyumlu, biyobozunur, kolay kullanılabilir ve doğal kemiğin mekanik özelliklerine benzer bir yapı göstermeli ve ekonomik olmalıdır [88- 89].

2.5.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri embriyonik gelişim sırasında, doku onarımında rol oynayan polipeptit yapısındaki kritik sinyal molekülleridir. Hücrelerdeki metabolik aktiviteler üzerinde etkileri sebebiyle, büyüme faktörleri hücre metabolizmasının sistemik ve lokal düzenleyicileridir [90]. Bu sinyal molekülleri hücre bölünmesini teşvik eden mitojenler, proliferasyonu uyaran ve farklı fonksiyonları da olan büyüme faktörleri ve doku tiplerinin oluşumunu sağlayan morfojenler olarak sınıflandırılabilir [91]. Sinyal molekülleri hedef hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Etki ettikleri preoteinler ve kofaktörler hücre çekirdeğindeki

transkripsiyon faktörlerini uyararak hücrel aktiviteri ve hücrelerin fenotiplerini belirleyecek olan genlerin ifade düzeylerini düzenlerler.

Osteoblastlar ve diğer kemik hücreleri birçok farklı büyüme faktörü ve sitokin sentezlesede kemik doku mühendisliğinde çoğunla insülin-benzeri büyüme (IGF), dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF- β), kemik morfojenik proteinleri (BMP), vasküler endotelyal büyüme faktörleri (VEGF) kullanılmaktadır.

2.5.2 Dönüştürücü Büyüme Faktörleri (TGF- β)

(TGF- β) hemen hemen bütün hücre tiplerinden ifade edilen önemli bir polipeptit olup hücrel olayların geniş bir aralığını düzenlemektedir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Vücudun bütün hücreleri tarafından ifade edilen edilen bu sitokin parakrin ve otokrin olarak trombosit, makrofaj, nötrofil, kemik, plasenta, böbrekler, endometrium ve malign hücreler tarafından da üretilir [92- 94]. Makrofajlar tarafından kendi üretimini otokrin yolla düzenler. Ayrıca monositleri uyararak fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), tümör nekroz faktör alfa 2 (TNF- α), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar [6]. Çoğunlukla TGF- β ekstra sellüler matriks birikimini sağlar ve fibrozise neden olur. TGF- β fibroblast kemotaksisini ve bu hücrelerce kollajen ve fibronektin üretimini uyarırken, metalloproteinazlarca hücre dışı matriksin yıkımını inhibe eder.

TGF- β ; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 olmak üzere 3 izoformdan oluşur ve bunlar heteromerik tip I ve tip II reseptör kompleksleri yoluyla sinyal verirler. Ligandın bağlanması TGF- β I reseptörü ile TGF- β II, serin/treonin kinaz arasında heteromik kompleksin oluşmasını sağlar. TGF- β I, TGF- β II tarafından fosforillenerek aktive edilir. Aktif olan TGF- β I reseptörü, hücre nukleusuna sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforiller ve aktive eder. SMAD ailesine ait proteinler, tip I reseptör kinazların tanımlanmış olan ilk substratlarıdır ve reseptör sinyallerinin hücre çekirdeği içindeki hedef genlere iletiminde merkezi bir rol oynar [95].

Gen ifade düzeyi ve linkaj çalışmaları TGF- β 'nın izoformlarından biri olan TGF- β 3 geninin dudak ve/veya damak yarıkları arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [96- 98]. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar damak gelişimi süresince TGF-

$\beta 3$ 'ün gerekli olduğunu ortaya koymuştur. TGF- $\beta 3$ 'ün hasara uğratıldığı fare çalışmaları damak yarıkları ile sonuçlanmıştır [99- 100]. Yapılan son çalışmalar TGF- $\beta 3$ 'ün damak yarıklarının tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir [101].

2.5.3 Kemik Morfogenetik Proteinleri

Kemik morfogenetik proteinleri, büyüme faktörleri grubundan transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süperailisinin yapısal ve fonksiyonel üyeleridir. 1965 yılında Urist'in mineralize olmayan kemik matiksini sıçanlardaki ektopik bölegelere implante edip kemik formasyonunun arttığını gözlemlemesiyle fark edilmişlerdir [12, 102]. 40 farklı türü tanımlanmıştır. Bu türler aminoasit benzerliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır. Homodimerik yapıda yaklaşık 30 kD ağırlığındadırlar. Birincil yapıları TGF- β ile % 40-50 benzerlik gösterir [103]. BMP'ler çoğu organ sisteminin, özellikle hücresel fonksiyonlar yönünden gelişimini sağlayan ve düzenleyen kritik büyüme faktörleridir. Bu düzenleyici etkilerini kök hücrelerin, progenitör hücrelerin ve normal hücrelerin çoğalmasını indükleyerek biyolojik reaksiyonların aktivasyonunda göstermektedirler [110]. Embriyogenez sırasında, dorsal-ventral desenlendirme, embriyonik vücut planı oluşturulması [104] , hücre apoptozisi [105], sinir hücrelerinin farklılaşması [106- 107], organogenez sırasında epitelyal-mezenkimal etkileşimleri düzenlemek gibi birçok görevleri vardır. Kemik indüksiyonu, onarımı ve bakımının yanı sıra, memeli organizmaların embriyonik gelişimleri süresince rol oynadıklarına dair birçok kanıt bulunmaktadır [108- 109]. Kemik morfojenik protein kodlanmasından ve sinyalizasyonundan bu güne kadar 20 kadar genin sorumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır [110].

Kemik morfojenik proteinlerinin kemik formasyonu ve iyileşmesinde en önemli rol oynayan büyüme faktörleri olduğu gösterilmiştir [110- 111]. Yetişkin memelilerde BMP, osteoblastlar ve osteositler tarafından sentezlenmekte ve primer olarak kemik ve dentinde yer almaktadır. BMP'lerin osteojenik aktiviteleri olgun olmayan, primitif hücreler üzerinde etkindir. Olgun osteoblastların BMP'ye yanıt vermediği tesbit edilmiştir [112]. In-vitro koşullarda yapılan çalışmalar mezenkimal hücrelere uygulanan BMP'in matriks üretiminde, alkalin fosfat düzeyinde ve tip I kollajen sentezinde artışa neden olduğunu göstermiştir [113- 114]. Bunun yanında mezenkimal hücrelerin sayısında artış meydana gelmemektedir [115- 116]. Bu sonuç BMP'ler mitojen olarak iş görmeyip morfojen olarak çalıştığını göstermiştir.

Kemik iyileşmesinde BMP'ler pluripotent kök hücrelerinin osteoblastik dönüşümünde rol alırlar. Bu sayede farklılaşmamış mezenkimal hücreler osteojenik dönüşümlerine başlayıp yeni meydana gelen kemiğin ekstraselüler matriksinin sentezi ve kalsifikasyonunda iş görürler [117]. Ayrıca bu stokinler matriks sentezini arttırırken, ALP ve COL1 sentezini indüklemektedir. BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'nin en etkin osteoindüktif özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler arasında kemik morfogenetik protein-2'nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür [118- 119].

Son zamanlarda bu sitokinlerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve günümüzde rekombinant BMP'ler doku mühendisliği ürünlerinde kemik ve doku yenilenmesini sağlama amacıyla yaygın kullanım alanına sahiptir.

Yapılan çalışmalarda kullanılan taşıyıcıların BMP'leri ilk 24 saatte saldığı gösterilmiştir. Fakat polimer yapıdaki taşıyıcıların kullanımıyla BMP'lerin kontrollü salımının gerçekleştirilebileceği ortaya konmuştur [120- 123].

Uygulanan malzemelerde BMP'nin 10 ng/ml ile 1 mg/ml arasındaki değerleri kullanılmıştır [124]. Kemik dokusunun doğal ortamında 1 µg/g BMP bulunduğu ve osteojenik farklılaşmayı indüklemek için gereken dozun 300 ng/ml değerlerinde seyrettiği göz önünde bulundurulursa pek çok uygulamada kullanılan dozun fizyolojik ortamdaki BMP dozundan çok daha fazla olduğu görülür [125].

2.6 Doğal polimerler

Biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerinden dolayı doku iskelesi olarak doğal polimerlerin kullanımı avantajlıdır. Jelatin, kollajen, kitosan, fibrin, aljinat, vb polimerlerin doğal olmalarından kaynaklanan avantajları yanında yük taşıma uygulamalarında düşük mekanik güç göstermeleri dezavantaj olarak sayılabilir. Bu dezavantajın üstesinden gelebilmek için doğal polimer yapısındaki malzemeler uygun kimyasallarla çapraz bağlanıp [126] ya da hidroksiapatit gibi seramiklerle kompozit yapılar oluşturulabilir [127].

Kollajen, osteoblast kemik hücrelerinden doğal olarak salgılanan temel organik bileşiktir. Kollajenin temel yapısı, üçlü sarmal oluşturan üç polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Kollajenin vücutta en çok bulunan hücre dışı matriks elemanı olması

sebebiyle kemik doku mühendisliğinde doku iskelesi materyali olarak sık kullanılmaktadır [126, 128, 129]. Kollajen tip-I, kemik dokusunda yaygın olarak eksprese olurken, kollajen tip-II kıkırdak ekstraselüler matriksinde yaygın şekilde bulunmaktadır. Bazı kollajen tipleri salgılanan kollajenazlarla bozunabilmektedir. Kollajen, domuz derisi ve inek derisi gibi ksenojenik kaynaklardan izole edilip saflaştırılabilir ve membran filmler, süngerler, iplikler ve asidik hidrojellere dönüştürülebilir [130]. Kollajenin düşük mekanik özelliklerinin üstesinden genellikle çapraz bağlama ile gelinmektedir [126]. Çapraz bağlama yapılsa dahi, tüm kollajen skafoldların mekanik özellikleri kısıtlıdır. Kollajen temelli skafoldlar deneysel ve klinik ihtiyaçlara göre modifiye edilebilir. Skafold üretiminde belli kolojen tiplerinin kullanılmasıyla hücrel farklılaşma sağlanabilir [131].

Genellikle kitosan, deniz kabuklularında ve fungal hücre duvarlarında bulunan deasetillenmiş bir kitin çeşitidir. Kitosan insan enzimleri tarafından parçalanabildiğinden doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [132]. Kitosan, yapısal olarak doğal glikozaminoglikanlara benzemektedir ve glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin β (1-4) şeklinde bağlı bir kopolimerdir. Lineer bir polisakkarit olan kitosan pozitif yüklü olup biyobozunur olması, biyouyumluluğunun yüksek ve işleme kolaylığından dolayı doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosan çözülerek çeşitli metodlarla jel şekline getirilip kullanılabilir [133]. Ayrıca kitosanın deasetilasyon derecesi değiştirilerek fizikokimyasal ve biyolojik yapısı değiştirilebilmektedir [134]. Bu özellikleri ile kitosan kemik doku mühendisliğinde kullanışlı hale gelmektedir [131].

Doku mühendisliğinde kullanılan doğal polimerler arasında bulunan fibrin polipeptid yapısında olup vücutta yara iyileşmesinde önemli bir role sahiptir. Kan damarlarında bir hasar meydana geldiğinde pıhtılaşma mekanizması fibrinojen moleküllerinin kendiliğinden toplanmasıyla oluşmaktadır. Fibrin oluşan kan pıhtılarında ya da kan plazmasında bulunan fibrinojenin ticari olarak işlenmesi ile elde edilebilmektedir [135].

Diğer bir doğal polimer olan aljinat, β -D-mannuronik asit ve (1-4) bağlı α -L-glukuronik asitin polimerleşmesi ile oluşan lineer bir polisakkarittir. Doku iskelelerinin oluşumunda Ca^{+2} gibi çok değerlikli katyonların varlığında çapraz bağlanabilir [136].

Doku mühendisliğinde dikiş ipi olarak yıllardır bir doğal polimer olan ipek kullanılmaktadır. İpek böcekleri ve örümcekler tarafından fiber formda üretilen fibroz yapıda bir proteindir. İpek yüksek düzeyde mekanik güce sahiptir ki bu nedenle kemik doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılması potansiyeli oluşturmaktadır. Ayrıca ipeğin yüzey karakterini, kimyasal immobilizasyon veya arjinin-glisin-aspartat (RGD) gibi peptitlerin fiziksel adsorbsiyonu ile modifiye etmek mümkündür [137, 138].

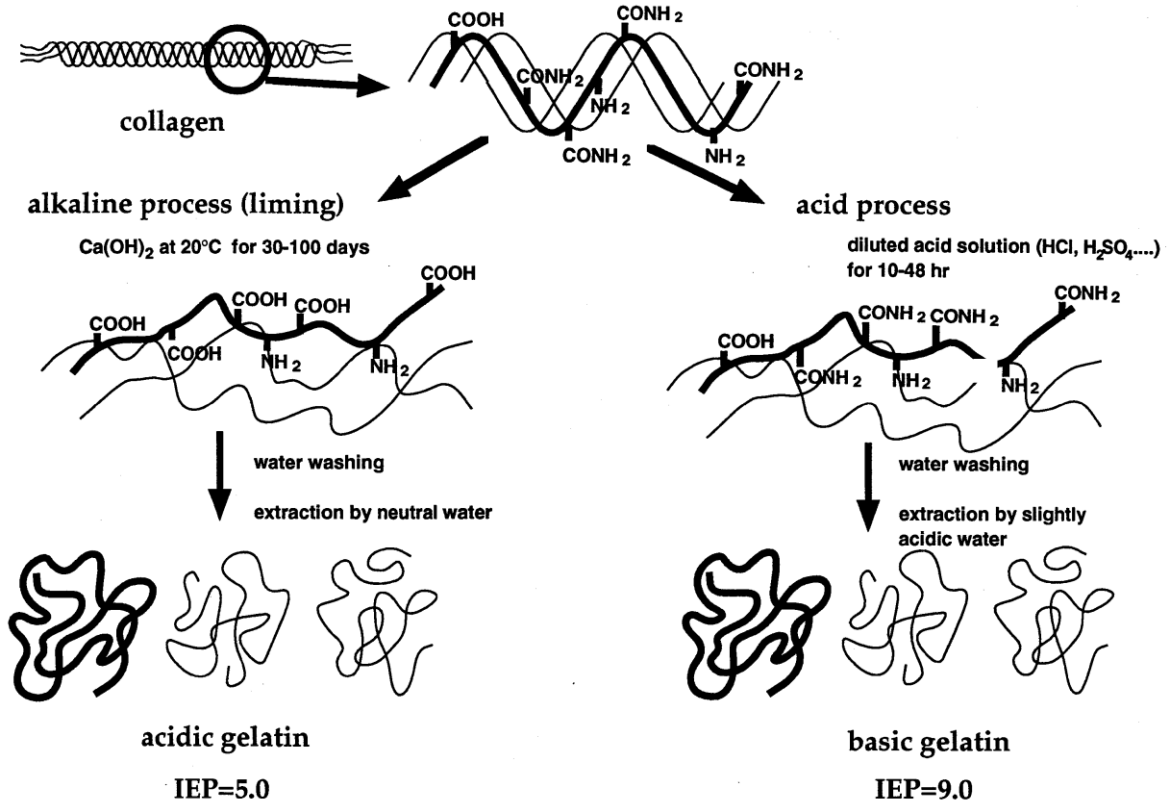
Doku mühendisliğinde kullanılan bir diğer polimer de lineer ve viskoelastik yapıda yüksek moleküler ağırlığa sahip olan ve tüm bağ doku yapılarında bulunan hiyaluronik asittir. Hücre dışı matriksin temel bileşeni olmakla beraber hücrenin yüzeyindeki proteinlere özgün olarak bağlanabilirler. Doku mühendisliğinde umut vadeden bir doku iskelesi potansiyelinin olmasında bu özelliklerinin yanı sıra farklılaşma, yara iyileşmesi ve enflamasyonda rol almasında etkili olmaktadır [130, 139].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen poliester yapısında biyopolimer olan polihidroksialkanoatlar (PHAs) doku mühendisliği uygulamaları için uygun yapılardır [140]. Bu polimerler ısı yoluyla işlenebilirler ve biyobozunurdurlar. PHA'lar arasında yer alan poli(3-hidroksibutirat) kemik dokusuna adaptasyonu ve in vitro kemik oluşumunu desteklediği için ilgi çekmiştir [141, 142].

2.6.1 Jelatin

Jelatinin ana kaynağı domuz derisi, sığır derisi ve balık kemiği ve balık derisidir. Bu yapılardan jelatinin ekstraksiyonu asit, alkali, enzimatik ve sıcaklık/basınç olmak üzere dört işlemde yapılmaktadır [143- 144]. Vücutta en yaygın deri, tendon ve kemik gibi bağ dokularında bulunan kollajenin kimyasal, fiziksel veya ısıl denatürasyonu ile elde edilir [145- 146]. Hayvan esaslı kollajen asit hidrolizi sonucu Tip A jelatini ve alkali hidrolizi sonucu Tip B jelatini oluşturur. Jelatinin kollajenden 2 farklı yolla izolasyonu Şekil 2.8'de verilmiştir. Jelatinin fiziksel özellikleri renksiz ya da mat sarı renkli olabildiği gibi şeffaf yaprak, şerit, toz ya da granül halde de bulunabilmektedir [147- 148]. Jelatinin en önemli karakteristik özelliklerinden biri sulu çözeltilerinin 35-40°C' den daha aşağıdaki sıcaklıklarda jelleşme özelliği göstermesidir. Çünkü sıcak suda çözünüp soğudukça jel formuna dönüşmektedir. Ayrıca soğuk su içinde şişer ve yumuşar, ağırlığının 5-10 misli

suyu emip şişme özelliği taşır. Bu özelliklerinin yanında proteolitik enzimler, bakteriler, koruyucular, elektrolitler, anyonik ve katyonik polimerlerle etkileşmez [147- 149]. Jelatin; alkol, eter ve kloroformda çözünmez. Ayrıca aşırı asidik ortam (pH=2) ve yine aşırı alkali ortam ile (pH >10) geçimsizdir.



Şekil 2.8 Kollajenden 2 farklı yolla jelatin saflaştırılması

Kollajenle karşılaştırıldığında çok daha ucuz olması ve derişik çözeltilerinin kolay elde edilmesi gibi nedeniyle biyomalzeme olarak kullanımı oldukça yaygındır. Ayrıca çözeltilerinde kullanılan miktarlarının ve çapraz bağlanma miktarlarının değiştirilmesiyle bu malzemeye istenen biyobozunurluk seviyesi rahatlıkla kazandırılabilir. Ticari olarak birçok farklı fizikokimyasal yapıda olan jelatin formları bulunabilmektedir. Farmasötik ve medikal alanda oldukça yaygın kullanıma sahiptirler. Klinik uygulamalar jelatinin biyogüvenliğini kanıtlamıştır [150].

Biyomedikal alanda yaygın olarak katı dozaj şekillerinde (pastil, supozituar, sert-yumuşak kapsül, tablet), kontrollü salımda (mikrokapsül, mikroküre, tablet vb)

jelatin kullanımı oldukça yaygındır [151- 153]. Gıda, farmasötik ve fotoğraf endüstrileri, jelatinin başlıca kullanıldığı alanlardır [145, 143, 154].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 TGF β -3 ve BMP-2 Yüklü Jelatin Filmlerin Sentezlenmesi

Çalışmada öncelikle jelatin % 3 (w/v) oranında damıtık suda sıcaklık yardımıyla (38°C) çözülmüştür [135]. Daha sonra literatür bilgisi ışığında biyolojik aktivasyonları için gerekli olan miktarlarda “Dönüştürücü Büyüme Faktörü - β 3” (TGF- β 3) (20 ng) ve “Kemik Morfogenetik Protein 2” (BMP-2) (200 ng) ayrı filmler sentezlenmek suretiyle bu çözeltiye eklenmiştir [156, 157]. Çözelti dikdörtgen şekilli kalıplara dökülerek 1 gün süre ile kurumaya bırakılmıştır.

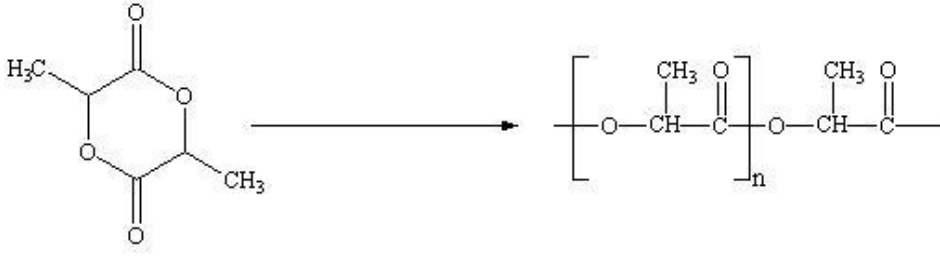
Elde edilen filmleri çapraz bağlamak için en uygun yöntem olan gluteraldehit buharı yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemle göre; filmler, içerisinde % 25'lik gluteraldehit içeren petri kabı bulunan vakum etüvünde 24 saat boyunca bekletilerek gluteraldehit buharı ile etkileştirilmiştir [157]. Reaksiyona girmeyen gluteraldehitin uzaklaştırılması için % 0,15'lik glisin çözeltisi etanol/su (80/20 v/v) karışımı içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltide filmler 4 saat süreyle bekletildikten sonra etanol ile yıkanmıştır. Bu şekilde, yapılan işlemler sırasında suda çözünebilir büyüme faktörlerinin kaybının en aza indirgenip verimin en yüksek olduğu bir yöntem uygulanmıştır.

3.2 Poli(L-laktat)/Poli(ϵ -kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi ve Polimerik Blendlerin / Doku İskelerinin Hazırlanması

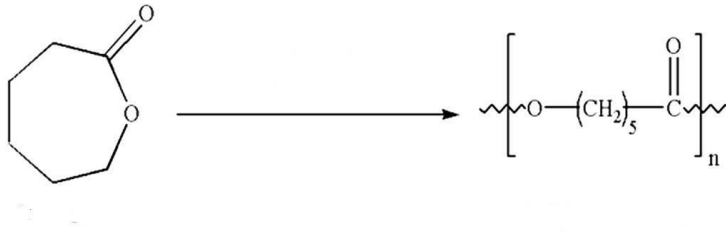
3.2.1 Poli(L-laktat)/Poli(ϵ -kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi

Çalışmanın polimer sentezi basamağında Halil Murat Aydın'ın Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalında optimize ettiği koşullar altında sırasıyla L-laktat (LLA) (Purac, Hollanda) dimeri, ϵ -kaprolakton (ϵ -CL) (Aldrich, Almanya) monomeri ve kalay oktoat (SnOc) (Sigma, ABD) ise katalizör olarak kullanılmıştır. Aynı koşullar altında laktat dimeri ve ϵ -kaprolakton monomerinin yığın polimerizasyonu yöntemi ile ayrı ayrı polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan LLA dimeri susuz toluen içerisinde çözülmüş ve yeniden kristallendirilerek saflaştırılıp kullanılmıştır. ϵ -kaprolakton monomeri, kullanılan tüm çözücüler ve katalizör hiçbir işlem uygulanmadan kullanılmıştır. Polimerizasyonlar için monomer/katalizör oranı ağırlıkça 1000 olarak seçilmiştir. Polimerizasyon reaktörü olarak cam balon kullanılmıştır. Polimerizasyon bu reaktörde vakum

altında, etüvde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1 ve 3.2’de sırasıyla PLLA ve PCL polimerizasyon reaksiyonları görülmektedir [131].



Şekil 3.1 Isı ve katalizör varlığında poli(L-laktat) polimerizasyon reaksiyonu



Şekil 3.2 Isı ve katalizör varlığında poli(ε-kaprolakton) polimerizasyon reaksiyonu

Polimerizasyon basamağında izlenen yol şöyledir: Seçilen LLA veya ε-CL ve monomer-katalizör oranına göre miktarları hesaplanan katalizör polimerizasyon reaktörüne konur. Katalizör susuz toluende çözülerek eklenir. Daha sonra oda sıcaklığında toluenin tamamı vakum varlığında uzaklaştırılır, reaktöre bir süre azot verilir ve ağzı kapatılarak polimerizasyon sıcaklığına getirilmiş etüve alınır ve reaksiyon başlatılır. Katalizörün homojen bir şekilde karışmasını sağlamak amacıyla ilk bir-iki saat reaktör çalkalanır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaktör etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında soğutulur. Balonun ağzı açılır, polimer susuz kloroformda çözülür ve soğuk metanolde çöktürülür. Elde edilen polimer vakum altında etüvde kurutulur, 4°C’de muhafaza edilir. Polimerizasyon sıcaklığı PLLA ve PCL polimerleri için 120°C’dir. PLLA için polimerizasyon süresi 30 saat seçilirken, PCL için 4 saat seçilmiştir [131].

3.2.2 Polimerik Blendlerin Hazırlanması

Bozunma davranışını ve mekanik özellikleri daha iyi şekilde kontrol edebilmek ve amaca uygun en iyi PLLA/PCL karışımının belirlenmesi için, yukarıda anlatılan

şekilde sentezlenen iki farklı molekül ağırlığına sahip iki polimer kullanılarak blendler hazırlanmıştır. Blend içerisinde bulunan düşük molekül ağırlığına sahip PCL'nin düşük molekül ağırlığından dolayı önce bozunması ve *in vivo* olarak hücre proliferasyonu için daha fazla yer sunması, yapıya esneklik kazandırılması düşünülürken, görece olarak daha yüksek molekül ağırlığındaki PLLA fraksiyonu oldukça yüksek gözenekliliğe (yaklaşık %90) sahip skafoldların yapısal bütünlüğünün korunması için yapıya dâhil edilmiştir. Blendler basitçe, elde edilen polimerlerin daha önceden belirlenmiş ağırlıklarda ayrı ayrı tekrar kloroform içerisinde çözünmesi (% 15 a/h) ve mekanik karıştırma altında, bu polimer çözeltilerinin oldukça etkin bir şekilde birbirleriyle karıştırılması, son olarak da soğuk bir çöktürme ortamında (metanol) çöktürülüp, kurutulmaları ile elde edilmiştir. 3 farklı PLLA/PCL blend oranı kullanılmıştır: %25 PLLA + %75 PCL (Blend A), %50 PLLA + %50 PCL (Blend B) ve son olarak %75 PLLA + %25 PCL (Blend C). Farklı 3 blend oranı kullanılarak hazırlanan doku iskeleleri ile yapılan 6 aylık *in vitro* bozunma deneyi ve mekanik testlerin sonunda %50 PLLA + %50 PCL blendi daha sonraki çalışmalar için gerek mekanik özellikleri, gerekse bozunma davranışı açısından uygun bulunmuştur [131].

3.2.3 Poli(L-laktat)/Poli(ε-kaprolakton) Doku İskelelerinin Hazırlanması

PLLA ve PCL polimerik blendi kloroform içerisinde çözülmüş (12 a/h) ve 250-355 µm partikül boyuna sahip NaCl kristalleri çözeltiye eklenmiştir. Karışım 8 mm çapındaki bir kalıba yerleştirilmiştir. Çözücü uçurulduktan sonra tuz partikülleri içeren polimerik doku iskelesi kalıptan çıkartılmıştır. Bir sonraki adımda tuz partikülleri 4 gün boyunca damıtık su içerisinde ekstrakte edilmiştir. Doku iskeleleri 25 °C'de vakum altında etüvde kurutulmuşlardır. Doku iskelelerinin gözenekleri arasındaki bağlantıların artırılması için süperkritik karbondioksit muamelesi yapılmıştır. Bu basamak aynı zamanda katalizör fazlalıkları, reaksiyona girmemiş monomerler ve buna ek olarak *in vitro* ya da *in vivo* çalışmalarda uzaklaştırılmamaları halinde hücreleri öldürebilen ve/veya toksik olabilecek reaktiflerin uzaklaştırılması için de kullanılmaktadır. Bu çalışma süperkritik karbon dioksit cihazı kullanılarak yapılmıştır. Seçilen parametreler şu şekildedir: Basınç: 2000 psi, Sıcaklık: 35 °C ve muamele süresi: 10 dakika [131].

3.3 TGF β -3 ve BMP-2 Yüklü Jelatin Filmlerin Doku İskelelerine Yüklmesi

Damak yarığı modeline uygun açık gözenek yapısında, birbiriyle bağlantılı geniş gözenekli biyobozunur doku iskeleleri (7x4x3 mm) hazırlanmıştır. Bu bölümde amaç, doku iskelesinin bozunması sırasında büyüme faktörlerinin sıralı olarak salınmasıdır. Bunun için şekil 3.3'de gösterilen modelde doku iskelelerinin lateralinde üçer yarık açılmıştır ve büyüme faktörü içeren jelatin filmlerin hazırlanan doku iskelesi modeline uygun olabilmeleri için filmler farklı boylarda kesilip yerleştirilmiştir. TGF- β 3 içeren jelatin filmler 5mmx3mm boyutlarında kesilip doku iskelesinde kenarlara yakın, BMP-2 içeren jelatin filmler ise 3mmx1mm boyutlarında kesilip merkeze yerleştirilmiştir. Burada, yüzeye yakın olan jelatin filmlerden TGF- β 3'ün erken salınması bunu takiben de merkezde bulunan jelatin filminden BMP-2'nin salınması amaçlanmıştır.



Şekil 3.3 Deney hayvanlarında cerrahi işlem ile yaratılan alveol defektlerine implante edilen jelatin film içeren örnek doku iskelesinin optik fotoğrafı

3.4 TGF β -3 ve BMP-2 Yüklü Jelatin Filmleri içeren Doku İskelelerinin Damak Yarığı Onarım Malzemesi Olarak Büyüme Faktörleriyle ve / veya Yalnız Başına İncelenmesi (In Vivo)

Bölüm 3.2' deki protokole göre hazırlanan skafoldlar in vivo olarak Wistar sıçanlarına yerleştirmiş ve 1. ve 4. aylarda denekler sakrifiye edilerek alveolar numuneler çıkartılmıştır. Deney sonrasında istatistik yöntemler kullanılarak histoloji çalışmaları yapılmıştır.

3.4.1 Skafoldların hazırlanması ve sterilizasyon

Hazırlanan skafoldlar, oluşturulacak alveolar defektlere oturacak şekilde (7x4x3 mm) kalınlığında kesilmiştir. Wistar sıçanlarına (n=96) implante edilmeden önce

gamma sterilizasyonu için uygun torbalara yerleştirilmiş 20 kGray gama ışınına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir.

3.4.2 Hayvan Deneyleri

Çalışmanın bu aşamasında ağırlıkları 350g ila 500g arasında değişen erkek wistar-albino sıçanlar kullanılmıştır. Denekler 12 saat gece ve 12 saat gündüz ortamında ad libitum olarak Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında beslenmişlerdir. Deney hayvanlarının kullanılması için gereken etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır. 23/02/2010 tarihli, 2010/7 no'lu izni ile gerçekleştirilmiştir.

Sıçanların anestezisi intraperitoneal ketamin/ksilazin enjeksiyonu ile sağlanmıştır. Denekler anestezi altında supin pozisyona getirilerek ağızları retraktör yardımı ile açılmış, povoidon ile lokal temizlik yapılmış, molar diş ve öndeki kesici diş arası bir cm'lik bölge mukozası bistüri ile tam kat kesilmiştir. Daha sonra dentoalveolar periost kaldırılmış ve alveolar kemiğe ulaşılmıştır. İnce uçlu bir matkap ile alveolar kemik (nazal kemiğe kadar) kesilerek 7x4x3 mm boyutlarında kemik defekti oluşturulmuştur (Şekil 4.2). Hemostazı takiben her gruba özgü işlemler gerçekleştirilmiş en sonunda insizyon eriyen 5/0 ipek ile tekli sütürler şeklinde kapatılmıştır. Tüm gruplarda bu cerrahi işlem standart olarak gerçekleştirilmiştir.

İşlem yapılan gruplardan kontrol grubunda (n=7) mekanik olarak defekt oluşturulduktan sonra herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Otogreft grubunda (n=7) aynı sıçanların iliyak kemiğinden alınan kemik greftleri defekte yerleştirilirken, deney grubuna hazırlanmış doku iskeleleri, defekti tam dolduracak şekilde yerleştirilmiştir. Paralel yürütülecek çalışmalarda 2 farklı denek grubuna sırasıyla "skafold/boş jelatin" ve bunların "büyüme faktörleri yüklenmiş jelatin film" formları implante edilmiştir. Deney bitiminde denekler sakrifiye edilmiştir. Bu sakrifiye işleminden önce (genel anestezi altında) deneklerden kan alınmıştır. Her bir gruptan n=7'şer denek histolojik ve morfolojik çalışmalar için 1 aylık ve 4 aylık sürelerde gözlemlenmiştir. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra, damak yarığının olduğu kısımdan alınan örnekler %2'lik paraformaldehit içinde sabitlenmiştir.

Gen ifade düzeyi çalışmaları için yukarıda açıklanan her gruptan 5'er denek kullanılmıştır ve belirtilen mekanik defektler deneklere aynı şekilde uygulanmış,

deneklerden 7. günde defekt bölgesinden biyopsi alınmıştır. 21. günde ise denekler sakrifiye edilmiştir. Örnekler sıvı azatta dondurulup, -80 C'de muhafaza edilmiştir.

GRUPLAR:

Grup1 = Kontrol (Defekt) Grubu

Grup 2 = Otogreft grubu

Grup 3 = Skafold / boş jelatin grubu

Grup 4 = Skafold/yalnız BMP-2 yüklenmiş jelatin film grubu

Grup 5 = Skafold/TGFβ3 / BMP-2 yüklenmiş jelatin film grubu

Histolojik ve morfolojik çalışmalar için her grupta, 1.ay 7 denek, 4. ay 7 denek incelenmiştir.

Gen ifade düzeylerini araştırmak için her grupta 7. gün 5 denek, 21. gün 5 denek incelenmiştir.

3.5 Gen İfade Düzeyi Çalışmaları

Kullanılan doku isklelerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla deneklere yerleştirilmiş olan skafoldun olduğu alandan 7 ve 21. günde alınan doku örneklerinde, kemik morfogenezi için belirteç olarak kullanılan genlerin ifade düzeyleri real time RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada, kollajen tip I (COL1a1), akciğer/kemik/böbrek alkalin fosfataz (ALPL), kemik gamma-karboksiglutamat (gla) protein (osteokalsin =Bglap = OC), osteonektin (SPARC), kemik siyaloproteini (BSP), runt ilişkili transkripsiyon faktörü (Runx2) ve referans gen olarak bir housekeeping gen olan (tüm canlı hücrelerde stabil olarak ifade edilen) GAPDH'ın ifade düzeyi mRNA seviyesinde saptanmıştır. Gen ifade düzeylerinin saptanmasında kullanılan basamaklar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

3.5.1 RNA izolasyonu

Deneklerden elde edilen defektli bölgeye ait dokular, steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun büyüklüğe getirilmiştir. DNaz ve RNaz free 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot

içinde dondurularak analizlerin yapılacağı güne kadar - 80°C'de muhafaza edilmiştir. Doku örneklerinden Chomczynski ve Sacchi tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/phenol-kloform metodunun modifikasyonu sonucu oluşan Trizol (İnvitrogen, USA) kullanılarak Ek-E'de verilen protokol ile toplam RNA'lar elde edilmiştir [165]. (Odabaş, 2011) Kontaminasyonun engellemesi amacı ile izolasyon işlemi güvenlik kabininin içinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların derişimi 260nm dalga boyunda nanodrop 2000 (Thermo Scientific, İngiltere) cihazıyla ölçülmüştür.

3.5.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

İzole edilen total RNA'ların derişimi ve saflıkları spektrofotometrik olarak (260/280 nm) saptandıktan sonra, 1µg/ml total RNA'dan, oligo dT₍₁₆₋₁₈₎ primerleri ve cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit- Roche) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan ters transkriptaz-PCR (RT-PCR) otomatik ısı döngüsü programı Çizelge 3.5.2.1'de verilmiştir.

Çizelge: 3.5.2.1 cDNA programında Otomatik Isı Döngüsü Programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Primer Bağlanması	37° C	5 dk	1
Ters Transkripsiyon	42° C	60 dk	1
İnaktivasyon	70° C	5 dk	1
Soğutma	4° C	-	1

Çizelge: 3.5.2.2 cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Derişim	Hacim
Steril H ₂ O	-	RNA miktarına göre değişken
Reksiyon Tamponu	5x	4µl
dNTP	1mM	2µl
Oligo DT	0.5µg/µl	1µl
RNaz İnhibitörü	20u/µl	1µl
Reverse transkriptaz	200u/µl	1µl
RNA	1µg	
Toplam		20µl

3.5.3 Real Time PCR

Gen ifade düzeyi çalışmalarını Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazını kullanarak belirlenmiştir. Amplifikasyonlar içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL problemler, master karışımı (FastStart Universal Probe Master, Roche) ve steril su kullanarak, 20 µl toplam tepkime hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi LightCycler® Carousel-Based System (Roche, İsviçre) cihazında çizelge 3.5.3.1'de verilen basamaklarda gerçekleştirilmiştir. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi çizelge 3.5.3.2'de verilmiştir. Kullanılan problemler Roche Diagnostic' ten temin edilmiştir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.5.3.1 Real Time PCR programı

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95°C	10sn	1
Amplifikasyon	95°C	10sn	45
	60°C	30sn	
	72°C	1sn	
Soğutma	40°C	10sn	1

Çizelge 3.5.3.2. Spesifik primer ve UPL prob sekansları

Hedef	5' 3' oligonükleotid sekansı
ALPL	Forward: GCACAACATCAAGGACATCG Reverse: TCAGTTCTGTTCTTGGGGTACAT UPL Probe #77 (Roche) Gen Bank No: NM_013059.1
BSP	Forward: CGGCCACGCTACTTTCTTTA Reverse: CGAACTATCGCCATCTCCAT UPL Probe #65 (Roche) Gen Bank No: NM_012656.1
COL1a1	Forward: CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT Reverse: GCAGCTGACTTCAGGGATGT UPL Probe #92 (Roche) Gen Bank No: NM_053304.1
GAPDH	Forward: GTGCCAAAAGGGTCATCATCTC Reverse: GGTTCACACCCATCACAAACATG Probe: (JOE)TTCCGCTGAT GCCCC-(BHQ1)
Osteocalcin	Forward: ATAGACTCCGGCGCTACCTC Reverse: CCAGGGGATCTGGGTAGG UPL Probe #125 (Roche) Gen Bank No: NM_013414.1
Osteonectin	Forward: TGAGACCTGTGACCTAGACAATG Reverse: CCAGATCCTTGTTGATGCCT UPL Probe: #65 (Roche) Gen Bank No: NM_012656.1
RUNX-2	Forward: CCACAGAGCTATTAAGTGACAGTG Reverse: AACAACTAGGTTTAGAGTCATCAAGC UPL Probe #98 (Roche) Gen Bank No: NM_053470.1

Bütün hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH housekeeping geni referans alınarak REST 2009 (Relative expression soft ware tool) yazılımı (QIAGEN, Almanya) kullanılarak hesaplanmıştır.

Göreceli gen ifadelerinin hesaplanmasında REST programı ve "Pfaffl" matematiksel yöntemi kullanılmıştır. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir [160].

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-hasta})}}$$

Eşitlikteki Ct değeri, tepkime sırasında oluşan flüoresans sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısına karşılık gelmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR verimliliği, eşitlikte elde edilen R ise oranını göstermektedir [161].

3.6 Histoloji ve Histomorfometri Çalışmaları

Kemik örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisinde tespit edildikten sonra 1 ve 4 aylık örnekler mikrotomografiye gönderildi. Mikrotomografi sonrası dokular De Castro çözeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) kontrollü olarak dekalsifiye edildi ve sabit vakumlu otomatik bir doku takip cihazı ile izlenerek parafine gömüldü. Üç-beş mikrometre kalınlığındaki kesitler hematoksilen eozin (HE) ve Masson trikrom (MT) ile boyandı. MT ile kompakt kemiğin kırmızı, osteoid ve kırıkdağın yeşil, hücre sitoplazmalarının eflatun boyandığı yüksek kontrastlı görüntüler elde edildi. Alveolar defekt alanı, bilgisayar ve dijital kamera (Leica DFC 480, Westlar Almanya) bağlantılı Leica DMR (Westlar Almanya) marka ışık mikroskobunda görüntülendikten sonra defekt alanı en küçük büyütmede saklanıp Qwin plus marka (Leica, Westlar Almanya) görüntü analiz programı ile kantitatif olarak değerlendirildi. Yeni trabeküler kemik alanlı total defekt alanına oranlanarak elde edilen piksel ölçümleri mikrometre kareye dönüştürüldü; elde edilen oran yüzde olarak kaydedildi [158, 159].

3.7 Mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) ile Radyomorfometrik Analiz

Denekler 1. ve 4. aylarda karbondioksit narkozu ile sakrifiye edilmiştir. Tomografik radyograflar, mikro-bilgisayarlı tomografi cihazı (Skyscan 1174, Belçika) kullanılarak maksiller kesici dişlerin labiyal yüzeyinden zigomatik arka kadar olan bölgeden elde edilmiştir. Elde edilen radyograflar üzerinden Nrecon Software (Skyscan 1174, Belçika) programı ile 21 μ m kalınlığında iki boyutlu kesitler alınmıştır. Şekillendirme öncesi ve sonrasında elde edilen mp formatındaki 2

boyutlu kesitler 3D-Doctor (v.3.5 Able Software Corp; Lexington, MA) medikal analiz programına aktarılmıştır. 3D-Doctor volume render ve surface render gibi işlemler deneğin 2 boyutlu kesit görüntülerinde gerçek zamanlı olarak elde eder. Vektör tabanlı çalışan medikal modelleme programıdır. Segmentasyon, kesitlerin her biri için Hounsfield Değerleri'ne göre yapılır. Microct'de her bir vokselde hesaplanan X-ışını zayıflatma degerini standart bir deger ile belirtmek amacıyla Hounsfield skalası olarak adlandırılan bir referans sistemi kullanılmaktadır. Hounsfield skalasında x-ışını atenuasyon degerleri -1000 ve 1000 arasında 2000 birim içerisinde sınıflandırılmıştır. Segmentasyon yapılırken standardizasyon amacı ile referans noktaları belirlenmiştir. Boundary işlemine tabi tutulan kesitler dekupe edilip, gerekli düzeltmeler yapılmıştır. Elde edilen görüntülerin 3D surface renderingi kalibrasyonu yapılan kesitler üzerinde yapılmıştır. STL formatında kaydedilen görüntüler NURBS (non uniform rotational b spline) temelli Rhinoceros 3D(Robert McNeel & Associates, Seattle, USA) analiz programına aktarılmıştır. 3 boyutlu görüntülerin uzaysal düzlemde orta hattan alınan kesitleri ve bu kesitler üzerinden yapılan analizleri oluşturulan bu stl formatı üzerinden yapılmıştır.

3.8 Biyokimyasal Çalışmalar

Genel anestezi altında denekler sakrifiye edilmeden önce kalplerinden kapalı punksiyonda 5cc kan alınmıştır. Antikoagulant olarak EDTA kullanılmıştır. Örnekler 1000g'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda plazmaları ayrılan örnekler ölçümlerin yapılacağı güne kadar -80°C'de saklanmıştır. Kemik özgü ALP aktivitesi Rat Bone Alkaline Phosphatase (BALP) ELISA Kit (Cusabio, Çin) kullanılarak tespit edilmiştir. Optik yoğunlukları mikropate okuyucu (ASYS, İngiltere) ile ölçülmüştür.

3.9 İstatiksel Çalışmalar

Bağımsız değişkenler gruplar, bağımlı değişkenler histolojik, biyokimyasal ve radyolojik ölçümlerdir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Tüm veriler parametrik olmayan testlerle (çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için posthoc Dunn testi) değerlendirildi. Spearman korelasyon testiyle biyokimyasal, radyolojik ve histolojik verilerin korelasyonu

değerlendirildi. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle özetlendi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 In-vivo Çalışmalar

Damak yarıkları için yeni doku mühendisliği stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla yürütülen tez çalışması kapsamında damak yarıklı hayvan modeli oluşturulmuştur. Bu model Wistar-albino sıçanlar üzerinde uygulanmıştır.

In vivo çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu H.Ü.ET-2010/7 dosya nolu kararı ile uygulanmıştır. Bu model temel olarak şöyledir: Alveolar kemikte 7mm çapında bir hasar oluşturulmuştur. Bu hasar bölgesinin zamana bağlı iyileşmesi 4 farklı grupta 4 ay boyunca izlenmiştir. Tez kapsamında tasarlanan hayvan modeli ve ayrıntıları bölüm 3.4.2' de detaylı olarak anlatılmıştır. Operasyon sonrası her bir sıçan dikkatlice incelenmiş, rutin aktivitelerinde ve hareket kabiliyetlerinde farklılık gözlenmemiştir. Bu gruplar kısaca,

- i) Kontrol (Defekt) Grubu
- ii) Ototogreft grubu
- iii) Skafold/boş jelatin grubu
- iv) Skafold/yalnız BMP-2 yüklenmiş jelatin film grubu
- v) Skafold/ TGF β 3/BMP-2 yüklenmiş jelatin film grubu

Çalışmalar hakkında genel prosedür önceki bölümlerde verilmiştir. Hasar bölgesinde uygulanan cerrahi operasyon görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 A)Sıçan damağının ağız içinden görünümü B)Sıçanlarda oluşturulan alveolar kemik defektinin yandan görüntüsü

4.2 Gen ifade Düzeyi çalışmaları

Hayvan modellerinden elde edilen örneklerde TGF- β 3 ve BMP-2'nin kemik oluşumuna etkisi histolojik, radyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde araştırılmıştır. Moleküler düzeyde yapılan araştırmalarda kemik gelişimi ve ECM yapısı için önemli olan temel genler seçilmiştir. Bunlar temel olarak Kollajen Tip I (COL1a1), akciğer/kemik/böbrek alkalin fosfataz (ALPL), kemik gamma-karboksiglutamat (gla) protein (osteokalsin) (Bglap) (OC), osteonektin (SPARC), kemik Siyaloproteini (BSP), runt ilişkili transkripsiyon faktörü (Runx2), ve kontrol amacı ile bir housekeeping gen olan (tüm canlı hücrelerde ifade olan) GAPDH olarak ifade edilebilir.

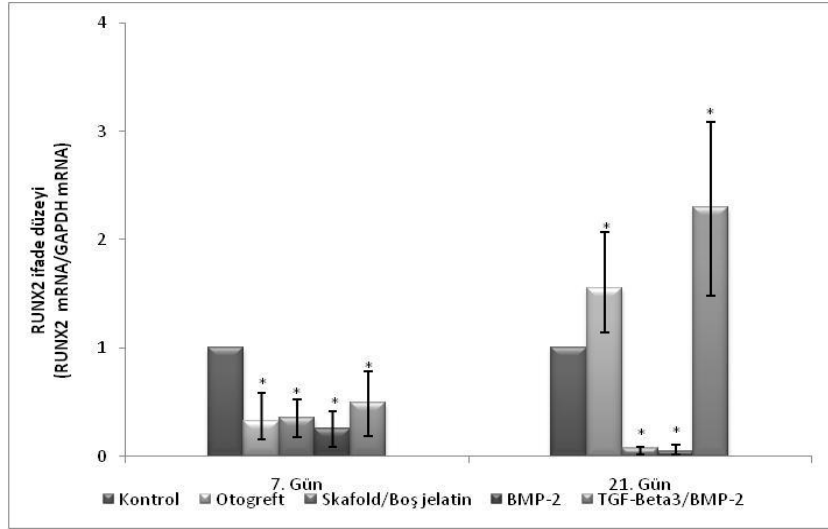
Erken dönem gen ifade düzeyi çalışmalarında örnekler 7. ve 21. günlerde incelenmiştir. Sonuçlar kontrol grubu, otogreft grubu, doku iskelesi boş jelatin grubu, doku iskelesi yalnız BMP-2 içeren jelatin film grubu, doku iskelesi TGF β -3 ve BMP-2 içeren jelatin film grubu olmak üzere, kendi aralarında ilgili genlere göre zamansal ve ifadenme düzeylerine göre incelenmiş ve analiz edilmişleridir. Elde edilen sonuçlar nicel olarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

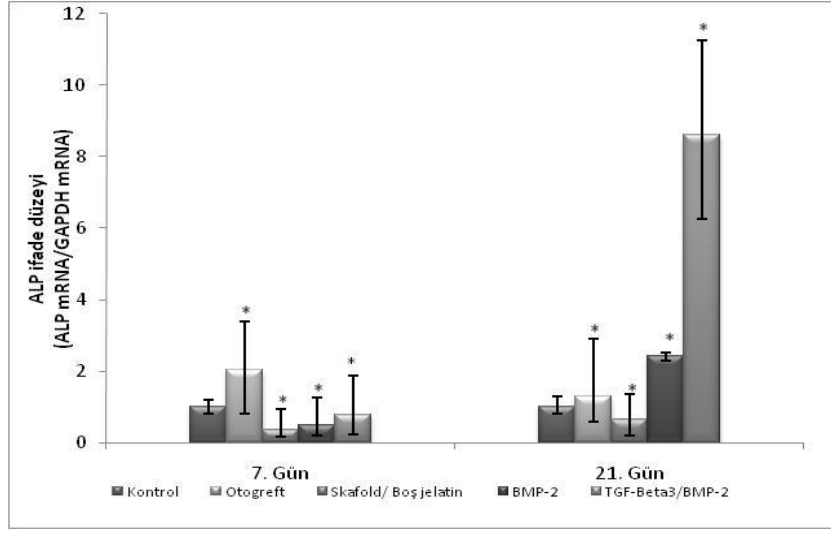
Gen ifadenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan her bir genin ve referans gen GAPDH'ın mRNA düzeyinde ifade düzeyini nicel olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrileri elde edilmiştir.

4.2.2 Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

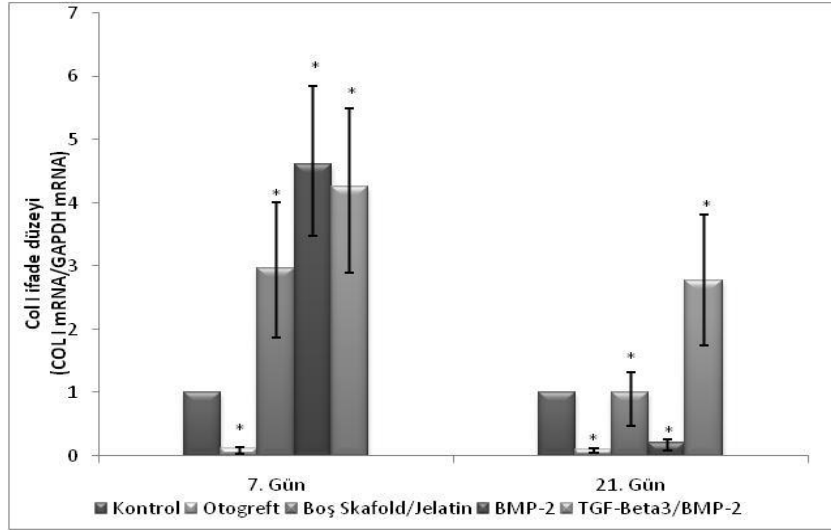
Real Time PCR'da primerlerin ilgili gen dizileri ile bağlanması bu genin ortamdaki derişimi ile doğru orantılıdır. Böylece bir gene ait mRNA ortamda ne kadar fazla bulunursa eşleşmeyle doğru orantılı seyreden amplifikasyonlar ışımının o kadar erken gerçekleşmesine neden olur [101]. Bu bilgiler ışığında gen ifade düzeylerinin zamansal ve grupsal incelenmesi ile ilgili ortaya çıkan grafikler Şekil 4.2; 4.3; 4.4; 4.5; 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. İfade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi QIAGEN-REST-2009 (Relative Expression Software Tool) programında gerçekleştirilmiştir. Bu yazılım 2 genin ifade düzeylerinin karşılaştırılmasına izin vermektedir. Gen ifade düzeylerine ait grafikler 2'li karşılaştırmalar sonucunda elde edilmiştir. Gen ifade düzeyleri ile ilgili çizelgeler ve istatistik değerleri Ek 3'te verilmiştir.



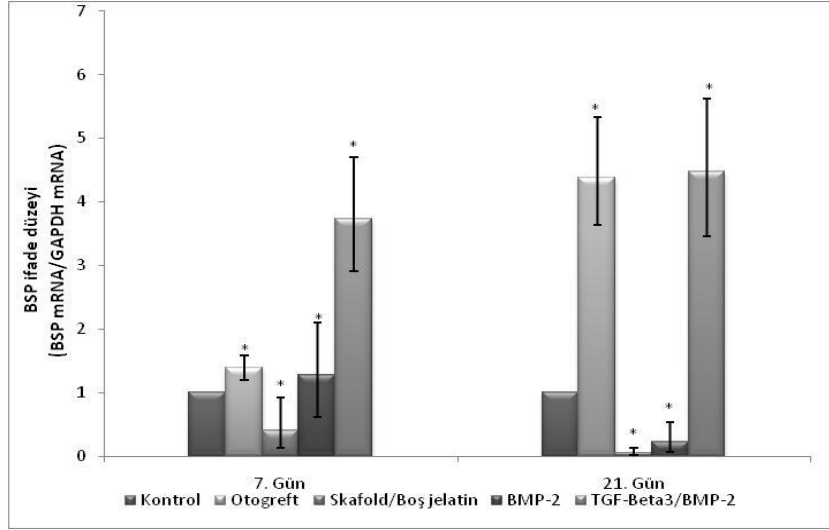
Şekil 4.2 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin Runx2 geninin ifade düzeyine etkisi.. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; p<0.05.



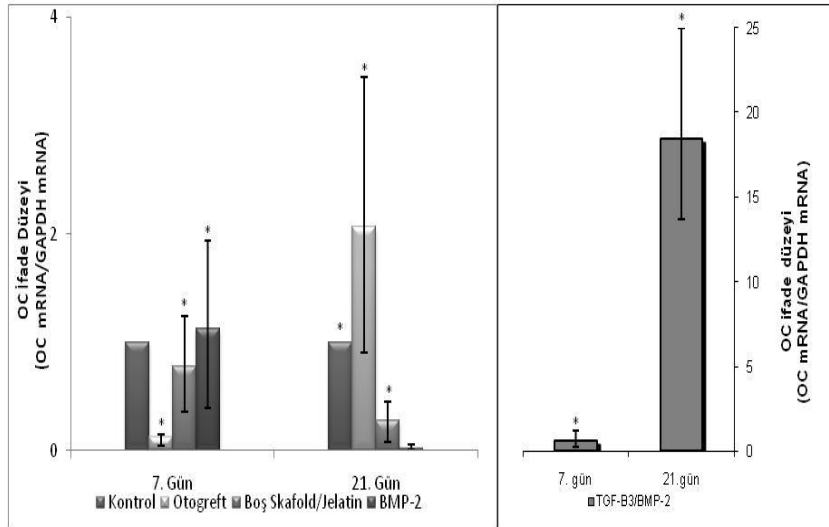
Şekil 4.3 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin ALP geninin ifade düzeyine etkisi. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$.



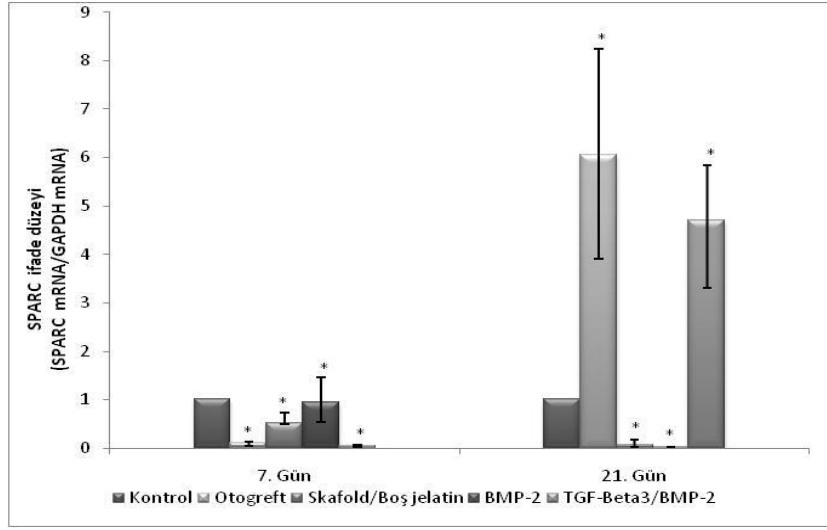
Şekil 4.4 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin COL1a1 geninin ifade düzeyine etkisi. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$.



Şekil 4.5 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin BSP geninin ifade düzeyine etkisi. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$.



Şekil 4.6 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin OC geninin ifade düzeyine etkisi. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$.



Şekil 4.7 Farklı büyüme faktörleri içeren doku iskelelerinin SPARC geninin ifade düzeyine etkisi. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$

Gen ifade düzeylerinin kontrol gruplarına göre karşılaştırılmasıyla elde edilen grafiklerin kendi aralarında ve gruplar arasındaki karşılaştırmaları hakkında şu görüşler ortaya konabilir;

- Kemik oluşumunun erken dönem belirteci olan (2-3 gün) Runx2 geninin 7. gün incelemelerinde bu genin kontrol grubuna göre down regüle olduğu gözlenmektedir. Fakat Runx2'nin BSP ve COL1 genlerini aktifleştirdiği bilinmektedir. Bu 2 genin 7. gün ifade düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmektedir. Bu veri ışığında Runx2'nin BSP ve COL1'in regülasyonunu sağlayıp kontrole göre down regüle olmaya başladığı düşünülebilir. 21. günde Runx2'nin otogreft ve TGF- β 3 / BMP2 grubunda tekrar ifade edildiği görülmektedir. Kemik oluşumunda Runx2'nin tekrar ifade edilmesi ALP, COL1 ve OC genlerinin ifade düzeylerini arttırmaktadır

- 7. günde BSP genini otogreft, BMP-2 ve TGF- β 3/BMP2 gruplarında ifade olmaktadır. TGF- β 3/BMP2 grubunun ifade düzeyi diğer 2 gruba göre anlamlı ölçüde fazladır. 21. gün BSP ifade düzeylerinde anlamlı farklılık 7. günde de olduğu gibi otogreft ve TGF- β 3 / BMP2 gruplarında gözlenmiştir

-COL1 geni 7. günde skafold / boş jelatin, BMP-2 ve TGF- β 3/BMP2 gruplarında ifade olmuştur. Bu gruplar arasında en yüksek ifade düzeyine sahip olan grup BMP-2 grubu olarak gözlenmiştir. BMP-2 grubunu boş jelatin grubu izlemiştir. Fakat bu gen kemik özgün olmadığından ifade düzeylerindeki her artış kemik oluşumuyla ilişkilendirilemeyebilir. COL1 ifade düzeyinin mekanik etkilerle arttığını gösteren çalışmalar vardır. [67,68] Kemik oluşumunda COL1'in ifade seviyesinin BSP ifade düzeyiyle paralel arttığı bilinmektedir. 7. gün verilerinde yalnız TGF- β 3 / BMP2 grubunda COL1 ve BSP genlerinin birlikte aktive olduğu görülmektedir. COL1 ifade düzeyinde anlamlı farklılık sadece TGF- β 3 / BMP2 grubunda gözlenmektedir. Bu sonuç RUNX2 ve ALP genlerinin ifade düzeylerindeki artışla paralellik göstermektedir.

-ALP geni 7. günde yalnızca otogreft grubunda up regüle edilmiştir. Bu grupta implante edilen otogreftin bünyesinde osteoblastları barındırdığı düşünülürse bu beklenen bir sonuçtur. 21. günde TGF- β 3/BMP2 grubunda diğer gruplara göre oldukça fazla ifade olmuştur. Bu değer Runx2'nin ifade düzeyiyle de korelasyon göstermektedir. Bu grubu BMP-2 ve otogreft grupları izlemektedir

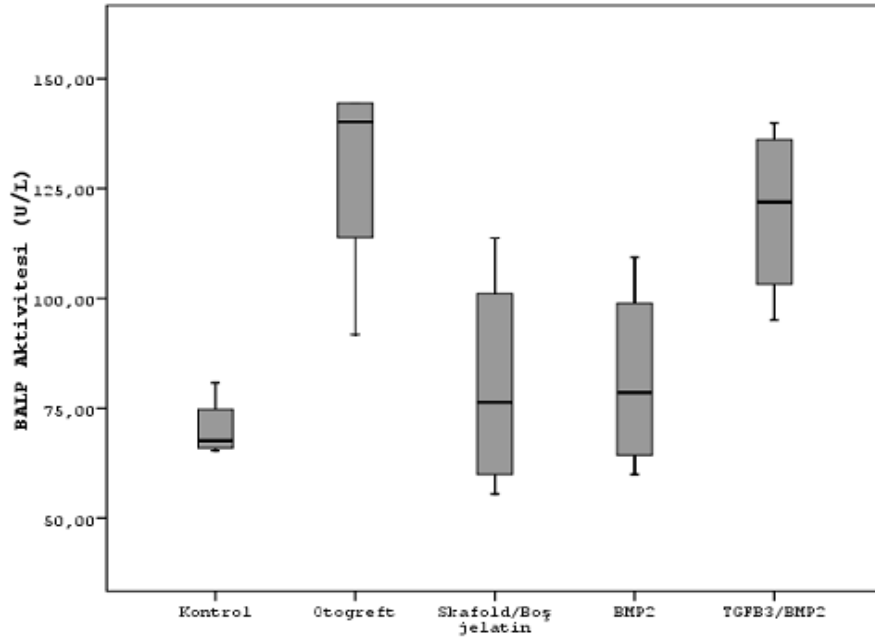
-Daha geç dönemde ifade edilen genlerden OC ifade düzeylerinde 7.günde bir farklılık gözlenmemiştir. Tümüyle kemik özgü bir gen olan OC geni 21. gün TGF- β 3/BMP2 grubunun gen ifade düzeyi diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.

-Daha geç dönemde ifade edilen genlerden SPARC ifade düzeylerinde 7.günde bir farklılık gözlenmemiştir. SPARC kemiğin mineralizasyon evresine geçtiğinin bir göstergesidir. Bu günde 21.günde otogreft ve TGF- β 3/BMP2 grubunda farklılık gözlemiştir. Bu gen için otogreft ifade düzeyinin TGF- β 3/BMP2 grubunda grubundan fazla olması beklenen bir sonuçtur.

4.3 Alkalen Fosfataz Aktivitesi

Kemik özgün alkalen fosfataz osteoblastların hücre yüzeyindeki veziküllerde bulunan enzimlerdir ve yeni kemik oluşumu sırasında osteoblastlarca kana salınır [162, 163].

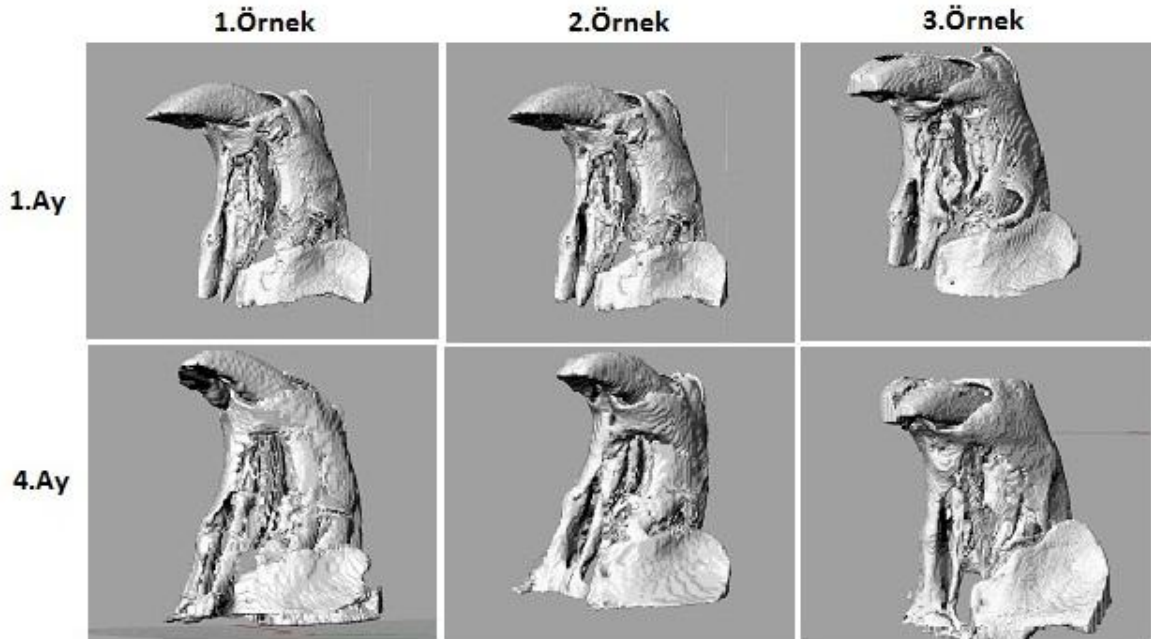
Deneklerden elde edilen örneklerin serum BALP miktarları 21. gün ve 4. aylarda incelenmiştir. Erken dönemde (21.gün) serum BALP seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Gen ifade düzeyi çalışmaları 21.gün örneklerinde ALP geninin henüz ifade edilmeye başladığını göstermektedir. . Bu bilgi doğrultusunda BALP 21. gün örneklerine ait sonuçlarla gen ifade düzeyi çalışmalarının 21. gün sonuçları paralellik göstermektedir. Gruplara ait 4. ay serum ALP aktivitesi sonuçları Şekil 4.9' da grafik haline getirilmiştir. Buna göre alkalen fosfataz aktivitesi, TGFβ-3/BMP-2 yüklenmiş jelatin filmlerin uygulandığı grupta skafold / boş jelatin grubuna ve BMP-2 grubuna göre daha fazla ölçülmüştür. En yüksek ALP aktivitesi beklendiği üzere otogreft grubunda gözlemlenmiştir. Otogreft grubu ve TGFβ-3/BMP-2 uygulanan gruplardaki yüksek ALP miktarları kemik oluşumunda öncül rol oynayan osteoblastların aktif olduğunun göstergesidir [164]. Bu bilgi doğrultusunda TGFβ-3/BMP-2 uygulanan gruplardan elde edilen sonuçların altın standart olan otogreft grubu sonuçlarına oldukça yakınlık gösterdiği söylenebilir.



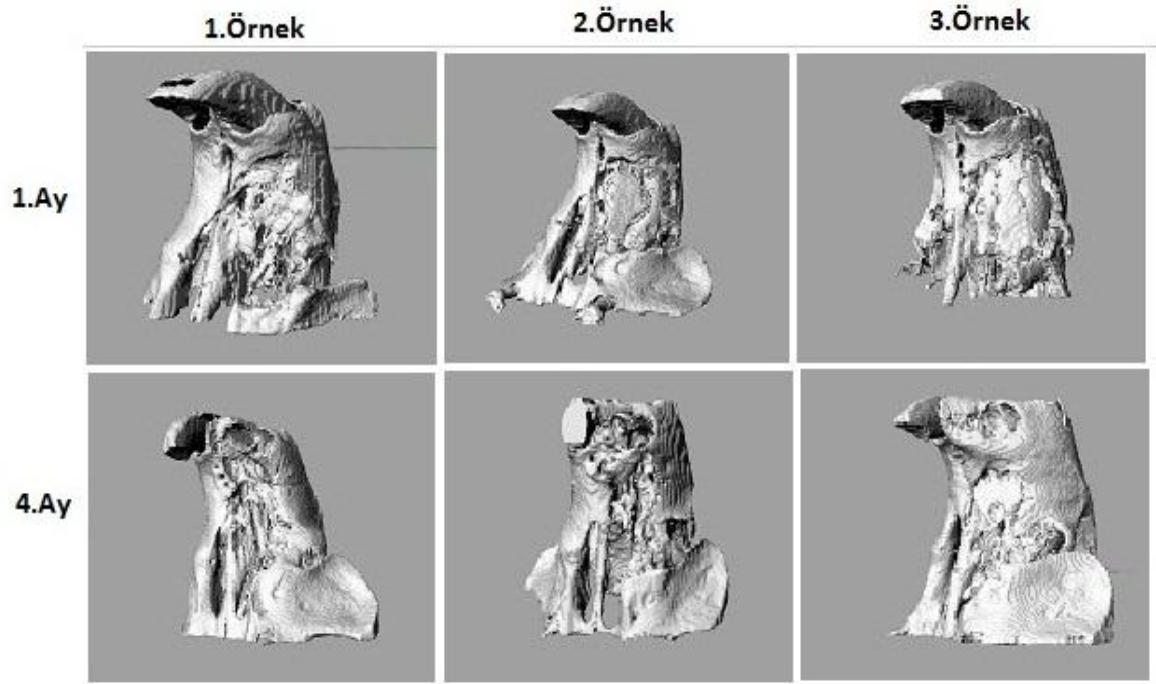
Şekil 4.8 Kontrol, otogreft, skafold/boş jelatin, BMP-2, TGFβ-3/BMP-2 gruplarına ait 4. ay BALP aktivitesi. P<0.05

4.4 Mikro-bilgisayarlı Tomografi (μ -CT) ile Radyomorfometrik Analiz

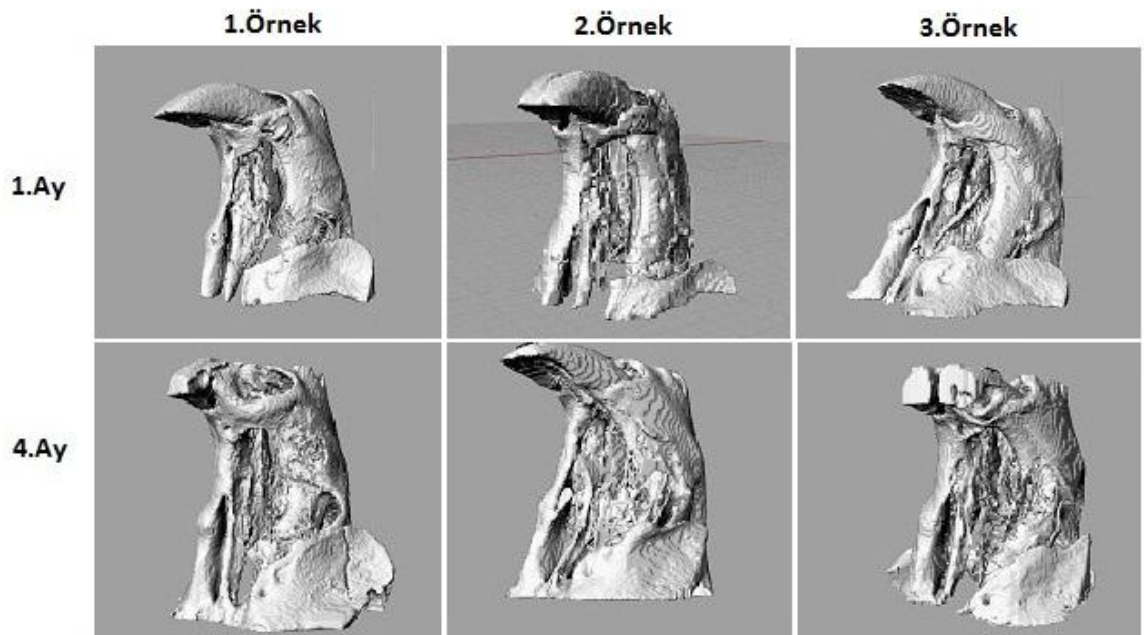
Hayvan deneyi çalışmalarının sonunda 1 ve 4 aylık sürelerde örnekler operasyon ile hasar bölgesinden çıkartıldıktan sonra histolojik analizlerinden önce tomografik incelemeleri yapılmıştır. Tomografik incelemede amaç, hasarlı bölgede oluşan yeni kemiğin tespiti. Bu bölümde her gruptan 7'şer hayvan incelenmiştir. İnceleme sonucunda elde edilen tomografik radyograflardan her gruba ait 3'er tomografik radyograf Şekil 4.10; 4.11; 4.12; 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmiştir. Yeni oluşan kemik alanının tayini 3D görüntülerin 3D-Doctor (v.3.5 Able Software Corp; Lexington, MA, A.B.D.) medikal analiz programında deneklerin üst çenesi santral dişlerin arasından geçen bir hattan simetrik olarak ikiye bölünerek çenenin operasyon görmeyen sol segmentindeki toplam kemik hacminin çenenin sağında alveol defekti oluşturulan segmentindeki toplam kemik hacminden çıkarılmasıyla bulunmuştur.



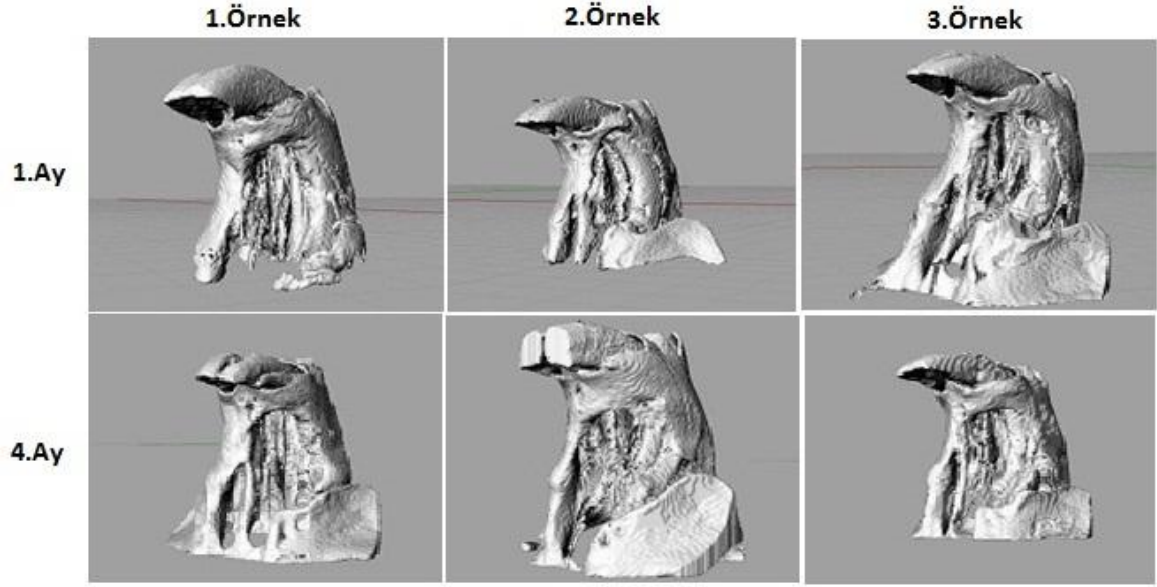
Şekil 4.9: Kontrol (defekt) grubunun 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar



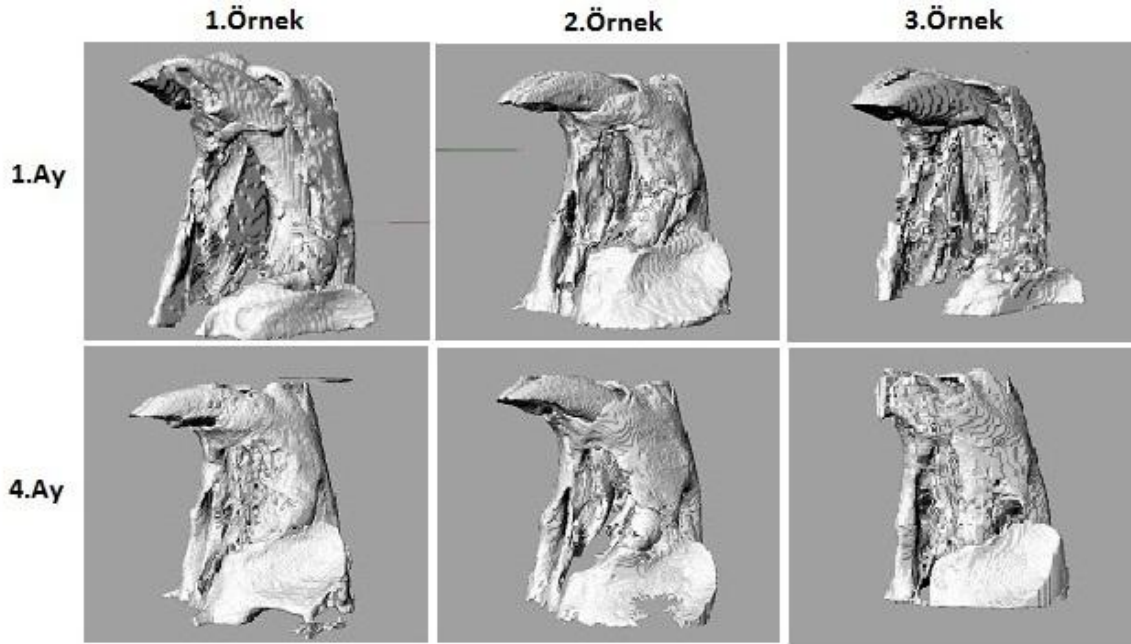
Şekil 4.10: Otogreft grubunun 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar



Şekil 4.11 Scaffold/Boş jelatin grubunun 1.ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar

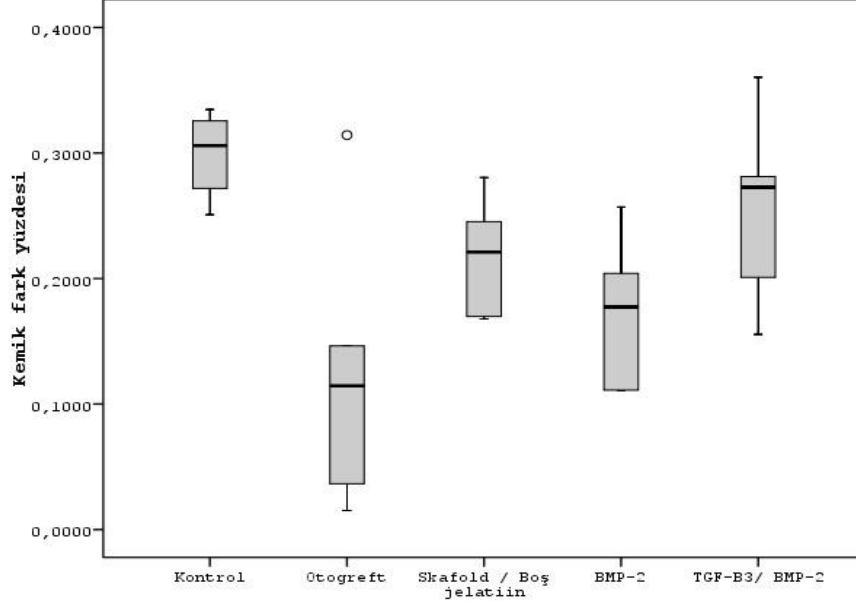


Şekil 4.12 Scaffold/BMP-2 grubunun 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar



Şekil 4.13 TGF β -3/BMP2 grubuna ait 1. ve 4. aylarına ait tomografik radyograflar

1. ay tomografik incelemeleri sonucunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Bu veriler ışığında oluşturulan grafik Şekil 4.15' de verilmiştir.



Şekil 4.14 Çenenin operasyon görmeyen sol segmentindeki toplam kemik hacmi farkının çenenin sağında alveol defekti oluşturulan segmentindeki toplam kemik hacmin yüzde farkına ait grafik

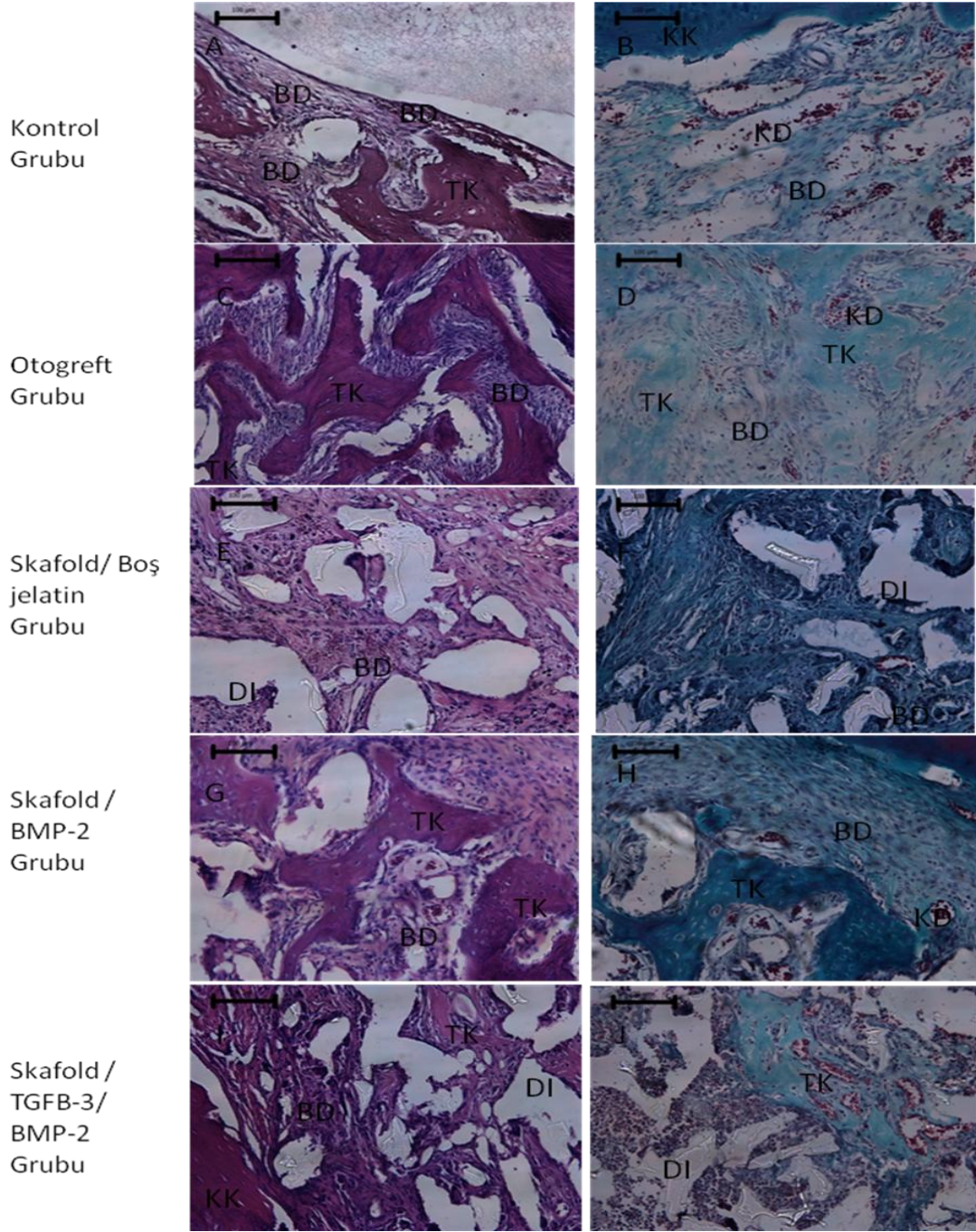
Grafikteki değerler sağlıklı dokudaki kemik hacmi ile hasarlı dokudaki kemik hacminin arasındaki farkın yüzdesini verdiği için grafikteki değer ne kadar küçük olursa yeni kemik oluşumunun o kadar fazla olduğunun göstergesidir. Beklenildiği üzere zaten deneğin kendi iliyak kemiğinden implante edilmiş otogrefti taşıyan otogreft grubunda sağlıklı doku ile hasarlı doku arasındaki farkın en az olduğu görülmüştür. 1. ay sonuçlarında otogreft grubunu BMP-2 ve skafold / boş jelatin grubu izlemektedir. Fakat bu değerler diğer parametrelerle korelasyon göstermemiştir.

4.5 Histolojik Bulgular

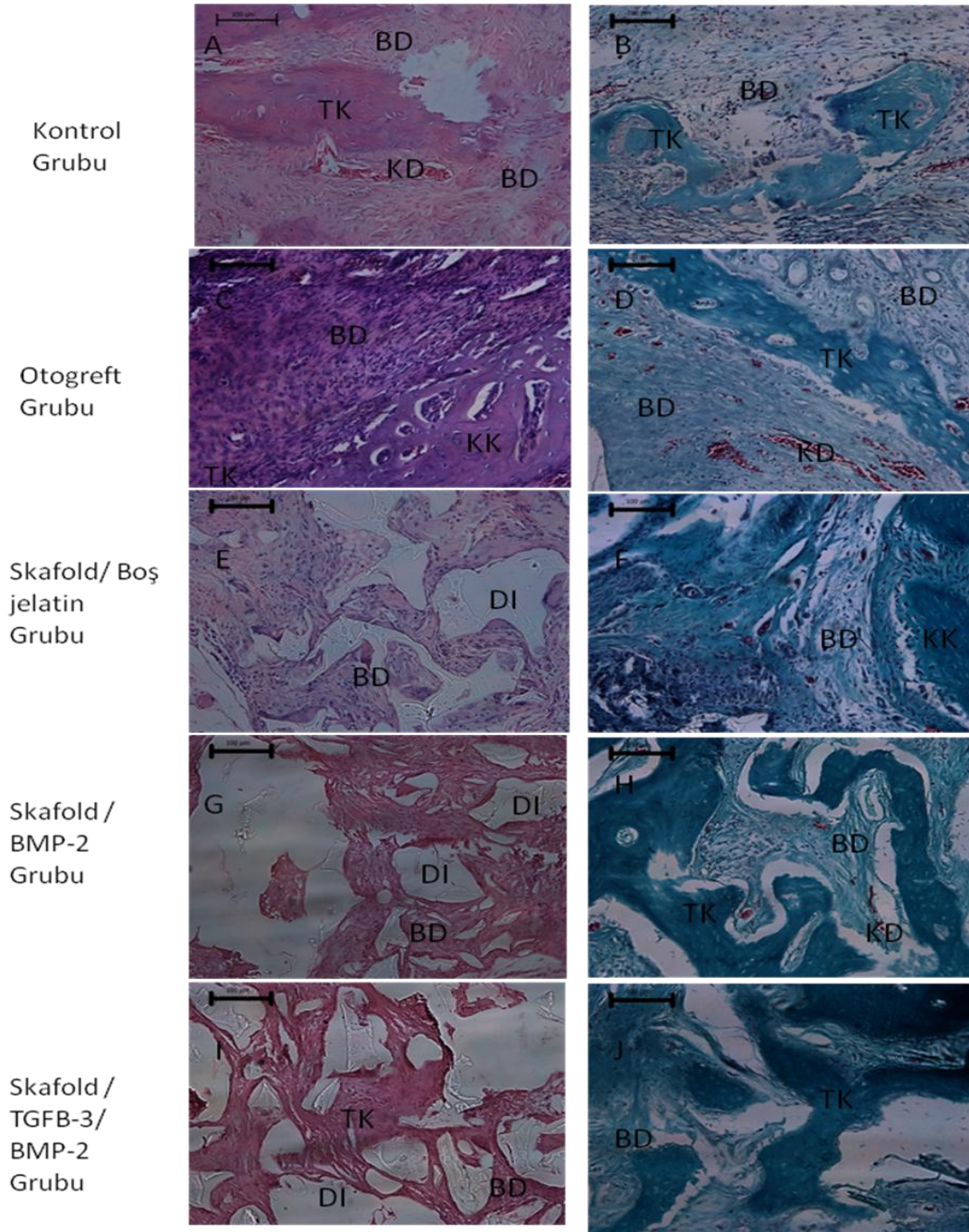
Birinci ayda otogreft grubundaki yeni oluşan kemik miktarı tüm defekt alanı ile oranlandığında kontrol grubu, boş doku iskelesi grubu ve BMP uygulanmış doku iskelesi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı (sırasıyla $p=0.011$, $p=0.004$, $p=0.016$). Dördüncü ayda otogreft uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı boş doku iskelesinin uygulandığı gruba göre daha çoktu ($p=0.00$). Dördüncü ayda yine TGF- β 3 / BMP-2 uygulanan grupla yalnız BMP-2 uygulanan gruptaki yeni kemik miktarları boş doku iskelesinin uygulandığı gruba göre daha çoktu (sırasıyla $p=0.008$ ve $p=0.008$). Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman

dilimlerinde otogreft uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı hızlanmıştır. Dördüncü ayda BMP-2 uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı altın standart olan otogreft uygulamasını yakalar düzeyde belirgin biçimde artarken, bu değer TGF- β 3 / BMP-2 uygulanan grupta daha yüksektir (Şekil 4.16, 4.17). Buna rağmen grupların hiçbirisinde kritik büyüklükteki alveol defekti tam olarak kemikleşmemiştir. Bu durum literatür ile uyumludur.

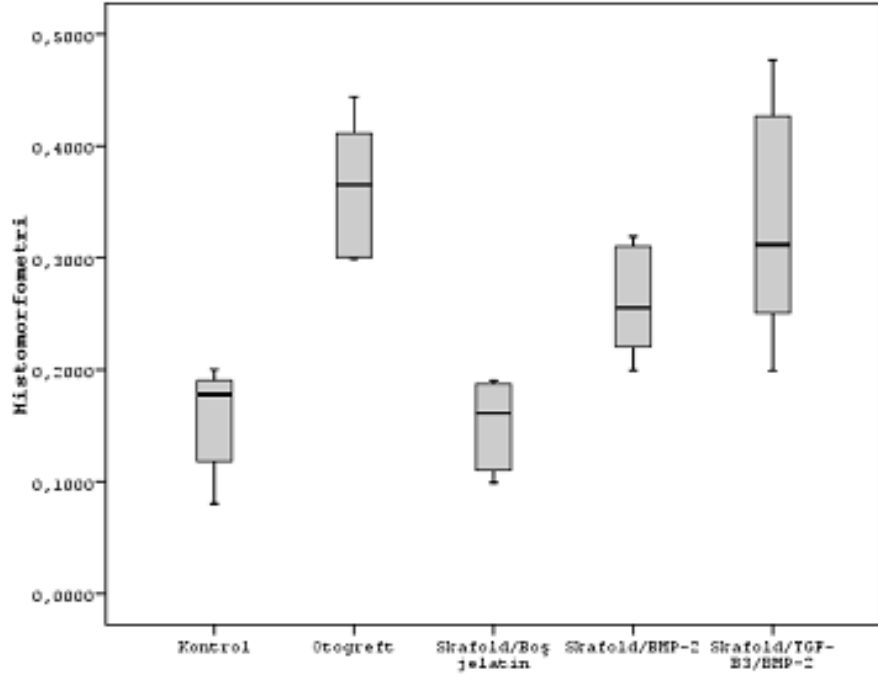
Doku iskelesi ve taşıyıcı olarak jelatin uygulanan gruplarda biyomalzemeye hafif ila orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Daha önce biyomalzemenin doku uyumu başka çalışmalarımızda nicel olarak değerlendirilip biyouyumlu olarak saptandığından, bu çalışmada skorlanmamıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte hiçbir örnekte ve zaman diliminde fibrozis (skar dokusu), nekroz ve ciddi yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmamıştır. Biyomalzeme çevresinde intramembranöz yoldan yeni kemik spiküllerinin oluşumu izlenmiştir. Otogreft ve büyüme faktörleri uygulanan gruplarda defekti dolduran bağ dokusu damardan daha zengin ve oluşan yeni kemik trabekülleri diğer gruplara göre daha büyüktü. Ancak gruplardaki denek sayılarının kısıtlılığı nedeniyle gruplar arasında her zaman anlamlı farklılıklar izlenemedi. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'de 1. ve 4. aya ait histomorfometri grafiği verilmiştir.



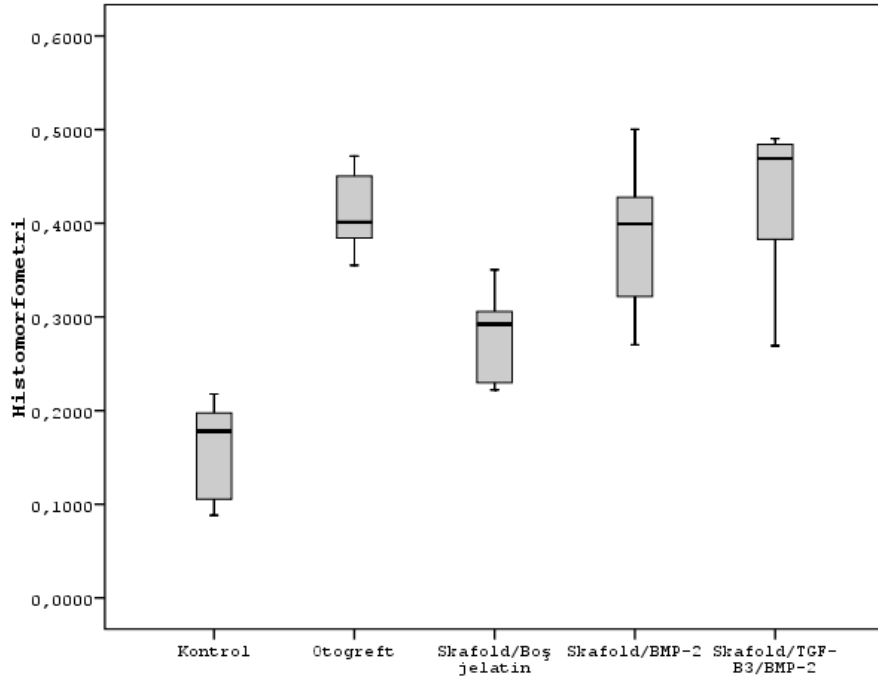
Şekil 4.15 1.ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları. Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 1 aylık alveolar defekt alanına ait tümü 200'lük büyütmede elde edilmiş mikrograflardır. Otogreft ve BMP doku iskelesi gruplarında kavitedeki yeni kemik miktarının kontrole göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Doku iskelesi gruplarında(E-J) biyomalzeme uygulanan alanlar takip sırasında eridiklerinden yerlerinde boşluklar kalmıştır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, DI: Doku iskelesi, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom



Şekil 4.16 4.ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları. Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 4 aylık alveolar defekt alanına ait tümü 200'lük büyütmede elde edilmiş mikrograflardır. Otogreft ve BMP doku iskelesi ve TGF BMP doku iskelesi uygulanan gruplarda kavitedeki yeni kemik miktarının boş doku iskelesi grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Doku iskelesi gruplarında(E-J) biyomalzeme uygulanan alanlar takip sırasında eridiklerinden yerlerinde boşluklar kalmıştır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, DI: Doku iskelesi, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom



Şekil 4.17 1. Ay sonuçlarına ilişkin histomorfometri grafiği



Şekil 4.18 4.ay sonuçlarına ilişkin histomorfometri grafiği

5. SONUÇLAR

Tez kapsamında, biyouyumlu ve biyobozunur PLLA/PCL gözenekli polimerik doku iskeleleri kullanılmıştır.

Tez kapsamında, büyüme faktörlerinin taşıyıcısı olarak %3 oranında (w/v) jelatin filmler sentezlenmiştir. Bu filmler glutraldehit buharı ile çapraz bağlanmıştır.

Tez kapsamında, sentezlenen büyüme faktörü taşıyan veya taşımayan jelatin filmler skafoldlara laminatlar şeklinde yerleştirilmiştir.

Tez kapsamında, in-vivo hayvan modeli olarak sıçan (Wistar Albino) alveol defekti modeli seçilmiştir.

Tez kapsamındaki in-vivo çalışmalarda toplam 95 hayvan incelenmiştir.

Tez kapsamındaki in-vivo çalışmalar kontrol, otogreft, skafold / boş jelatin, BMP-2, TGF- β 3/BMP-2 grupları olmak üzere 5 grupta incelenmiştir.

Tez kapsamındaki in-vivo çalışmalarda sıçanın üst çenesinde 7x3x4mm³ lük bir alanda yaratılan alveol defektinin iyileşmesi gruplara bağlı olarak gen ifade düzeyi çalışmaları için 7. ve 21. günlerde, histoloji ve micto CT çalışmaları için 1. ve 4. aylarda incelenmiştir.

Erken dönem gen ifade düzeyi çalışmalarında Kollajen Tip I (COL1a1), akciğer/kemik/böbrek alkalin fosfataz (ALPL), kemik gamma-karboksiglutamat (gla) protein (osteokalsin) (Bglap) (OC), osteonektin (SPARC), Kemik Sialoproteini (BSP), Runt ilişkili transkripsiyon faktörü (Runx2) ve GAPDH genleri incelenmiştir.

Erken dönem gen ifade düzeyi çalışmaları için 7. ve 21. günlerde deneklerden örnekler toplanmıştır. Dokulardan RNA izole edilip, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lardan belirlenen primer ve proplar kullanılarak Real- Time PCR programında ilgili genlere ait mRNA derisimi belirlenmiştir.

Sonuçlar REST analiz programında, grupların kendi aralarında ikili karşılaştırılmaları yapıp zamana bağlı gen ifade düzeyleri saptanmıştır. Sonuçlar bir home-box gen olan GAPDH'a göre normalize edilmiştir.

Her grupta ilgili genlerin ifade düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmiştir. Özellikle TGF- β 3/BMP-2/Skafold grubunda kemik oluşumunda rol oynayan genlerin ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir.

Biyokimyasal analizler sonucunda zamana bağlı serum BALP değerleri belirlenmiştir. Erken dönem (21.gün) sonuçlarında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 4. ay sonuçlarında TGF- β 3/BMP-2 grubundaki BALP aktivitesinin pozitif kontrol grubu olan otogreft grubundaki aktiviteye oldukça yakın olduğu gözlenmiştir.

Tomografik incelemeler sonucunda 1 aylık gruplar arasında farklılık gözlenmiştir. Burda otogreft grubundaki kemik hacmi yüzdesinin diğer gruplardan fazla olduğu gözlenmiştir. 4. ay sonuçlarında istatistiksel bir anlam gözlenemesede yalnız TGF- β 3/BMP-2 grubunun 1. ve 4. ay sonuçları anlamlıdır ve bu grupta yeni kemik oluşumunun başladığını göstermektedir.

Histolojik incelemelerde dokular hematoksilin eozin ve Masson Trikrom boyaları ile boyanmış ve yeni kemik oluşumu zamana bağlı olarak incelenmiştir.

Yeni kemik oluşumu parametrik olmayan testlerle (çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için posthoc Dunn testi) değerlendirilmiştir.

Bu sonuçlara göre 1. ve 4. ay incelemelerinde BMP-2 otogreft uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı hızlanmıştır. Dördüncü ayda TGF- β 3/BMP-2 uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı diğer gruplara göre artış göstermiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında alveolar kemik defekti oluşturulan deney hayvanlarında defektin onarımı için, TGF- β 3 ve BMP-2 büyüme faktörlerini birlikte barındıran jelatin filmleri içeren PLLA/PCL gözenekli polimerik doku iskelelerinin zaman dilimleri içerisinde yeni kemik oluşumuna etkisi gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Millard D.R, Jr: Embryological Theories, Chapter 1, Volume1, in Cleft Craft : The Evolution of its Surgery, Little, Brown and Company, Boston, 1976
2. Millard D.R, Jr: The Bilateral Deformity, Volume 2, in Cleft Craft : The Evolution of its Surgery, Little, Brown and Company, Boston, 1976
3. Troxell JB, Fonseca RJ, Osborn DB. A Retrospective of Alveolar Cleft Grafting. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 40:721, 1982
4. Rosenstein S, Monroe C, Kernahan D, et al. The Case of Early Bone Grafting in Cleft Lip and Palate. *Plast. Reconstr. Surgery* 70:297, 1982
5. Rehrman AH, Koberg WR, Koch H, Long –term Post-operative Results of Primary and Secondary Bone Grafting in Complete Cleft of The Lip and Palate. *Cleft Palate J.* 7:6, 1969
6. Vargel İ. Damak Yarıklı Hastalarda Kemik Greftinin Yeri ve Kullanımı. *Dudak ve Damak Yarıkları.* S; 193-206, Editör; Prof. Dr. Yücel Erk, Prof. Dr. Figen Özgür, İşkur Matbaacılık Ltd. Şt. Ankara, 1999, ISBN 975-491-089-8
7. Rawashdeh MA. Morbidity of iliac crest donor site following open bone harvesting in cleft lip and palate patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Mar;37(3):223-7. Epub 2008 Feb 12
8. Hoffman W.Y., Mount D. Cleft Palate Repair. *Plastic Surgery. Volume IV. Chapter 95, 249-269, Second Edition.* Editor; Mathes S.J. Saunders Elsevier, Philadelphia, ISBN 0-7216-8811-X, 2006.
9. Sato Y, Grayson BH, Garfinkle JS, Barillas I, Maki K, Cutting CB. Success rate of gingivoperiosteoplasty with and without secondary bone grafts compared with secondary alveolar bone grafts alone. *Plast Reconstr Surg.* 2008 Apr;121(4):1356-67; discussion 1368-9
10. Zhang, H., Sucato, D. J., Welch, R. D. (2005). Recombinant human bone morphogenetic protein-2-enhanced anterior spine fusion without bone encroachment into the spinal canal: A histomorphometric study in a thoracoscopically instrumented porcine model. *Spine* 30: 512.
11. Choi, S. H., Kim, C. K., Cho, K. S., et al. (2002). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs (1965). *J. Periodontol.* 73:63.
12. Urist MR, Strates BS. (1971) Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50:1392–1406
13. Wozney JM, Rosen V, et al. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528.

14. Chin M, Boyne P, et al. (2001). Distraction osteogenesis with bone morphogenetic protein enhancement in the extension of edentulous alveolar bone. *The Proceedings of the 3rd International Congress on Cranial and Facial Distraction Processes*, Paris, p.19–22.
15. Chin M. (2003). Bone morphogenetic protein enhancement of alveolar distraction in humans. *From the Proceedings of the 4th International Congress on Cranial and Facial Distraction Processes*, Paris, p.49–51.
16. Chin M, Carstens M, et al. (2003). Distraction osteogenesis with bone morphogenetic protein enhancement: facial cleft repair in humans. *The Proceedings of the 4th International Congress on Cranial and Facial Distraction Processes*, Paris, p.197–200
17. Pelton, R. W., Hogan, B. L., M., Miller, D. A., Moses, H. L. (1990). Differential expression of genes encoding TGF- β 1, β 2 and β 3 during murine palate formation. *Dev. Biol.* 141:456.
18. Fitzpatrick, D. R., Denhez, F., Kondaiah, P., Akhurst, R. J. (1990). Differential expression of TGF- β isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109:585.
19. Proetzel, G., Pawlowski, S. A., Wiles, M. V., Yin, M., Boivin, G. P., Howles, P. N., Ding, J., Ferguson, M. W. J., Doetschman, T. (1995). Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nature Genet.* 11:409.
20. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschman, T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693.
21. Kulkarni, A. B., Huh, C., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor- β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:770.
22. Sanford, L. P., Ormsby I., Groot A. C. G., Sarinola H., Friedman R., Boivin, G. P., Cardell E. L., Doetschman T. (1997). TGF- β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF- β knockout phenotype. *Development* 124:2659.
23. Brunet, C. L., Sharpe, P. M., Ferguson, M. W. J. (1995). Inhibition of TGF- β 3 (but not TGF- β 1 or TGF- β 2) activity prevents normal Mouse embryonic palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 39:345.
24. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL: Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4:743, 2004

25. Paganelli C, Fontana P, Porta F, et al: Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. *J Oral Rehabil* 33:625, 2006
26. Carstens MH, Chin M, Ng T, et al: Reconstruction of #7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): Role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant. *J Craniofac Surg* 16:1023, 2005
27. Cohen SR, Kalinowski J, LaRossa D, Randall P. (1991). Cleft palate fistulas: a multivariate statistical analysis of prevalence, etiology, and surgical management. *Plast. Reconstr. Surg.* 87:1041
28. Kruger GO. Text Book of Oral and Maksillofacial Surgery. St.Louis: The CV Mosby; 1984.
29. Branemark PI, Lindstrom J, Hallen O, Breine U, Jeppson PH, Ohman A. Reconstruction of the defective mandible. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1975; 9: 116-28
30. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler TOTB_D (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi 2004; Cilt: 3 Sayı: 3-4
31. Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 1964;46-B:110-40
32. Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF: Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000, 31(3):357-74
33. Bronzino, J.D.(Ed.), 1995, The Biomedical Engineering Handbook, CRC Press.
34. Noyan, A. (Ed), 1990, Fiziyoloji Ders Kitabı, Meteksan A.ğ., Ankara
35. Ayvalı, C. (Ed), 2002, Hayvan Histolojisi Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi; Ankara.
36. Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am* 1991 35:469-477
37. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC (ed). *Bone Mechanics Handbook*. 2. ed. CRC Press, Florida, 2001 1- 68
38. Junguera L.C, Carneiro J, Kelly R.O. Temel Histoloji 8. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Şti. 1988 132- 151
39. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001; 22 :2581-2593

40. Junguiera, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. Temel Histoloji. 8.Baskı. Ğstanbul: Baris Kitabevi Ltd. Sti. 1998; 132-151.
41. Dietz, G., Bartholmes, P. Calcium Hydroxide and Bone Regeneration. Odontological Aspects of Induced Osteogenesis in Experiment and Clinical Practice. Monography. 1998, Byblos Verlag, Munich.
42. Soydan, N. Genel Histoloji. Ğ. Ü. Dishekimliđi Fakóltesi. İstanbul: Ğ.Ü.Basımevi ve Film Merkezi.1992; ISNB 975-404-276-4.
43. Güven, Y. Kıkırdak, Kemik ve Diş Biyokimyası. Ğ. Ü. Dishekimliđi Fak. Biyokimya Bilim Dalı Ders notları, 1988 Mart.
44. Pelker, R. and Friedlaender, G., 1987, Biomechanical aspects of bone autografts and allografts, Orthop. Clin. N. Am., 18, 235–239.
45. Sevitt S Bone repair and fracture healing in man. Chirchil Livingstone, Edingburg, 1981
46. Aydın, BK., Pentoksifilin Kullanımının Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisinin Ratlarda İncelenmesi, T.C. Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi Ve Travmatoloji Kliniđi Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2007
47. Brond AR, Rubin TC. Fracture Healing. In: *Surgery of the Musculoskeletal System*. Churchill Livingstone, New York 1: 93–114, 1990.
48. Gartner Leslie P, Hiatt James L. Cartilage and bone. *Color Textbook of Histology*. Saunders, Saint Louis, 114–130, 1997.
49. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament In: *Fractures*. Philadelphia, Lippincott Company, 1:147–167, 1984.
50. Shui, C., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L. and Khosla, S.J Bone Miner Res 2003; 18:213-21
51. Qi, H., Aguiar, D. J., Williams, S. M., La Pean, A., Pan, W. and Verfaillie, C. M.Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:3305-10
52. Roelofsen, J., Klein-Nulend, J. and Burger, E. H.J Biomech 1995; 28:1493-503
53. D'Addario, M., Arora, P. D., Ellen, R. P. and McCulloch, C. A.J Biol Chem 2003;
54. Jagodzinski, M., Drescher, M., Zeichen, J., Hankemeier, S., Krettek, C., Bosch, U. And van Griensven, M.Eur Cell Mater 2004; 7:35-41; discussion 41
55. Yoshikawa, T., Peel, S. A., Gladstone, J. R. and Davies, J. E.Biomed Mater Eng 1997; 7:369-77

56. Klein-Nulend, J., Roelofsen, J., Semeins, C. M., Bronckers, A. L. and Burger, E. H. *J Cell Physiol* 1997; 170:174-81
57. Pavlin, D., Dove, S. B., Zadro, R. and Gluhak-Heinrich, J. *Calcif Tissue Int* 2000; 67:163-72
58. Pavlin, D. and Gluhak-Heinrich, J. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12:414-24
59. Pavlin, D., Zadro, R. and Gluhak-Heinrich, J. *Connect Tissue Res* 2001; 42:135-48
60. Yuge, L., Okubo, A., Miyashita, T., Kumagai, T., Nikawa, T., Takeda, S., Kanno, M., Urabe, Y., Sugiyama, M. and Kataoka, K. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311:32-8
61. G. R. Kirkham and S. H. Cartmell, *Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis*, Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini, 2007.
62. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. *Cell* 1997; 89:747-54
63. Selvamurugan, N., Chou, W. Y., Pearman, A. T., Pulumati, M. R. and Partridge, N.C. *J Biol Chem* 1998; 273:10647-57
64. Kern, B., Shen, J., Starbuck, M. and Karsenty, G. *J Biol Chem* 2001; 276:7101-7
65. Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T. and Nakatsuka, M. *J Biol Chem* 1999; 274:6972-8
66. Shimizu-Sasaki, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiya, H., Sodek, J. and Ogata, Y. *J Biol Chem* 2001; 276:5459-66
67. Jagodzinski, M., Drescher, M., Zeichen, J., Hankemeier, S., Krettek, C., Bosch, U. and van Griensven, M. *Eur Cell Mater* 2004; 7:35-41; discussion 41
68. Klein-Nulend, J., Roelofsen, J., Semeins, C. M., Bronckers, A. L. and Burger, E. H. *J Cell Physiol* 1997; 170:174-81
69. Melkko J, Niemi S, Risteli L, Risteli J. Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type 1 procollagen. *Clinical Chemistry* 1990; 36: 1328-1332.
70. Melkko J, Kauppila S, Niemi S ve ark. Immunassay for intact amino-terminal propeptide of human type 1 procollagen. *Clinical Chemistry* 1996; 42: 947-954.
71. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM, Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone, 1989 Jul;69(3):990-1047.

72. Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *New Eng J Med.* 1980;302:1460-6
73. Gundberg CM, Nishimoto SK. Vitamin K dependent proteins of bone and cartilage. In: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP eds. Academic Press, San Diego;1999, 43-58
74. Terpos E, Politou M, Rahemtulla A, The role of markers of bone remodeling in multiple myeloma, 2005 May;19(3):125-42.
75. Rotllant J, Liu D, Yan YL, Postlethwait JH, Westerfield M, Du SJ, Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear, 2008 Jul;27(6):561-72.
76. Brekken, R.A., Sage, E.H., 2001. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix communication. *Matrix Biol*
77. Castillo and Charles H. Turner, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006. 8:455–98
78. Langer, R. and Vacanti, J.P., 1993, *Tissue engineering*, *Science*, 260, 920.
79. Lee, K. Y., Mooney, D. J., 2001, *Hydrogels for tissue engineering*, *Chem Rev.*, 101, 1869-1879.
80. Ahsan. T, Nerem, R.M., 2005, *Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry*, *Orthod Craniofac. Res.*, 8: 134.
81. Shin, H., Jo, S., Mikos, A. G., 2003, *Biomimetic materials for tissue engineering*, *Biomaterials*, 24, 4353-4364.
82. Bisceglie V. 1933. *Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-Embryonen.* *Ztschr. Krebsforsch.* 40:122–40
83. Vacanti, J.P., Langer, R., 1999, *Tissue engineering: the design and fabrication of Living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*, *Lancet*, 354, 32-36.
84. Hubbell, J.A., 1995, *Biomaterials in tissue engineering*, *Biotechnology*, 13, 565-576.
85. Burg KJ, S Porter and J.F. Kelam, 2001; *Biomaterial developments for bone tissue engineering.* *Biomaterials* 21(23):2347-59.
86. Lee S-H. and Shin H., *'Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering'*, *Advan. Drug Del. Rev.*, 59 (4-5), 339-359 (2007).
87. Praemer, A., Furner, S. and Rice, P. 1992. *Musculoskeletal conditions in the United States.* Park Ridge: Am. Acad. Orthop. Surg. P. 1-85

- 88.Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN: Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001, 83-A(Suppl 2, Pt 2):98-103.
- 89.Finkemeier CG: Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(3):454-64.
- 90.Canalis, E., "Growth factors and their potential clinical value", *J Clin Endocrinol Metab Clinical Review.*, 75 (1): 1-4 (1992).
- 91.Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, 2011 Feb 6;8(55):153-70.
- 92.Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*. 1986; 233; 532–34
- 93.Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc*. 1983; 42: 2621–26
- 94.Centrella M, Canalis E. Transforming and nontransforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82: 7335–9
- 95.Soyoz M, Ozcelik N. TGF beta (transforming growth factor beta) ve sinyal iletimi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 27(4): 426-433, 2007.
- 96.Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC, Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans, 1998 Aug;63(2):557-68.
- 97.Bodo M, Baroni T, Carinci F, Becchetti E, Bellucci C, Pezzetti F, Conte C, Evangelisti R, Carinci P, TGFBeta isoforms and decorin gene expression are modified in fibroblasts obtained from non-syndromic cleft lip and palate subjects, *J Dent Res*. 1999 Dec;78(12):1783-90.
- 98.Sato, Fumihiko D.D.S., Ph.D.; Natsume, Nagato D.D.S., D.Med.Sc., Ph.D.; Machida, Junichiro D.D.S., Ph.D.; Suzuki, Shintaro D.D.S.; Kawai, Tsuyoshi D.D.S., Ph.D, Association Between Transforming Growth Factor Beta 3 and Cleft Lip and/or Palate in the Japanese Population, *Plastic & Reconstructive Surgery*: June 2001 - Volume 107 - Issue 7 - pp 1909-1910
- 99.Vesa Kaartinen, Jan Willem Voncken, Charles Shuler, David Warburton, Ding Bu, Nora Heisterkamp, John Groffen, Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction, *Nature Genetics* 11, 415 - 421 (1995)
- 100.Gabriele Proetzel, Sharon A. Pawlowski, Michael V. Wiles, Moying Yin, Gregory P. Boivin, Philip N. Howles , Jixang Ding, Mark W. J. Ferguson, Thomas Doetschman, Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion, *Nature Genetics* 11, 409 - 414 (1995)

101. TGF-beta-3 Promotes Scarless Repair of Cleft Lip in Mouse Fetuses K. Kohama, K. Nonaka, R. Hosokawa, L. Shum, and M. Ohishi *J Dent Res* 81(10):688-694, 2002
102. Urist M.R., 'Bone formation by autoinduction', *Science*, 150, 893–899 (1965).
103. Vaibhav B., Nilesh P., Vikram S. and Anshul C., 'Bone morphogenetic protein and its application in trauma cases: A current concept update', *Injury*, Available online 2007.
104. Jones CM, Lyons KM, Lapan PM, Wright CV, Hogan BL (1992) DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 115, 639-647
105. Zou H, Niswander L (1996) Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation [see comments]. *Science* 272, 738-741
106. Paralkar VM, Weeks BS, Yu YM, Kleinman HK, Reddi AH (1992) Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: potentiation and binding to type IV collagen. *J Cell Biol* 119, 1721-1728
107. Shah NM, Groves AK, Anderson DJ (1996) Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-343
108. Ripamonti U, Reddi AH (1992) Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 3, 1-14
109. Ripamonti U, Reddi AH (1997) Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 8, 154-163
110. Reddi AH. 1998; Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16: 247–252.
111. Reddi AH. 2005; BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 249–250.
112. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 9-21
113. Bottner M, Kriegstein K, Unsicker K The transforming growth factorbetas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* 2000; 75(6): 2227-40
114. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 1991; 113(3): 681-7

115. Bottner M, Kriegelstein K, Unsicker K The transforming growth factorbetas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* 2000; 75(6): 2227-40
116. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 1991; **113**: 681–687
117. Schilephake H Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31(5): 469-84
118. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 9-21.
119. Mayer M, Hollinger J, Ron E, Wozney J. Maxillary alveolar cleft repair in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a polymer carrier. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98: 247-59
120. Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43(4): 422-7
121. Peter SJ, Lu L, Kim DJ, Stamatias GN, Miller MJ, Yaszemski MJ, Mikos AG Effects of transforming growth factor beta1 released from biodegradable polymer microparticles on marrow stromal osteoblasts cultured on poly(propylene fumarate) substrates. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50(3): 452-62
122. Lu L, Stamatias GN, Mikos AG Controlled release of transforming growth factor beta1 from biodegradable polymer microparticles. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50(3): 440-51
123. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release.* 2000; 64(1-3): 91-102
124. Schilephake H Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31(5): 469-84
125. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 1991; 113(3): 681-7
126. Lee S-H. and Shin H., „Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering“, *Advan. Drug Del. Rev.*, 59 (4-5), 339-359 (2007).
127. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C. and Jansen J.A., „Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering“, *Advan. Drug Del. Rev.* 59, 234–248 (2007).

128. Lee, K. Y., Mooney, D. J., 2001, Hydrogels for tissue engineering, *Chem Rev.*, 101, 1869-1879.
129. Sanchez C., Arribart H. and Guille M.M., „Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems“, *Nat. Mater.*, 4, 277–288 (2005).
130. Cancedda R., Dozin B., Giannoni P. and R. Quarto „Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone“, *Matrix Biology*, 22 (1), 81-91 (2003).
131. Aydın H.M., *Biyobozunur Polimerik Materyaller ve/veya Bunların Kalsiyum Fosfat Kompozitlerinin Üretimi ve Sert Doku Onarımında Kullanımı*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 58s
132. Yılmaz, E., 2004, Chitosan: a versatile biomaterial, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 553:59-68.
133. Berger, J.M., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R., 2004, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57(1):35-52.
134. Martino A. D., Sittinger M. and Risbud M. V., ‘Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering’, *Biomaterials*, 26 (30), 5983-5990 (2005).
135. Özkızılcık, 2010, *Gözenekli Polimerik Doku İskelelerinden Kontrollü Bmp Salımı İçin Jelatin Mikropartiküllerin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara
136. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C. and Jansen J.A., ‘Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering’, *Advan. Drug Del. Rev.* 59, 234–248 (2007).
137. Habraken W.J.E.M., Wolke J.G.C. and Jansen J.A., „Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering“, *Advan. Drug Del. Rev.* 59, 234–248 (2007).
138. Wang Y., Kim H-J., G. V-Novakovic and D. L. Kaplan, ‘Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials’, *Biomaterials*, 27 (36), 6064-6082 (2006).
139. Kim J., Kim I. S., Cho T. H., Lee K. B., Hwang S. J., Tae G., Noh I., Lee S. H., Park Y. and Sun K., „Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenetic protein-2 and human mesenchymal stem cells“, *Biomaterials*, 28 (10), 1830-1837 (2007).
140. Chen G. Q. and Wu Q., „The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials“, *Biomaterials*, 26, 6565–78 (2005).
141. Doyle C., Tanner E. T. and Bonfield W., „In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite“, *Biomaterials*, 12, 841–847 (1991).

142. Köse G. T., Kenar H., Hasırcı N. and Hasırcı V., „Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 24 (11), 1949-1958 (2003).
143. Ward, A.G., M.A., F.P. Inst, 1954. The physical properties of gelatin solutions and gels. *Br. J. Applied Phys.*, 5: 85-90.
144. EFSA Biohazards Panel, 2006. Quantitative assessment of the human and animal BSE risk posed by gelatin with respect to residual BSE risk, *The EFSA J.*, 312: 1-29
145. Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri and K. Rubini, 2001. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degree of gluteraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22: 763- 768
146. Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri and K. Rubini, 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, 23: 4827-4832
147. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. , Pennsylvania: Mack Printing Company., 1990.
148. Digenis G.A., B.G. Thomas, V.P. Shah, Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro–in vivo performance, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 915–921.
149. The United States Pharmacopeia XXII, Easton: Mack Publishing Co., 1991.
150. Zekorn D. Intravascular retention, dispersal, excretion and breakdown of gelatin plasma substitutes. *Bibl Haematol* 1969;33: 131–40.
151. Welz, M. M., Ofner III, C. M., “Examination of self- crosslinked gelatin as a hydrogel for controlled release”, *J. Pharm. Sci.*, 81, (1992), 85-90.
152. Tabata, Y., Ikada, Y., “ Synthesis of gelatin microspheres containing interferon”, *Pharm. Res.*, 6, (1989), 422-427.
153. Tagawa, K., Kawata, M., Goto, S., “Biopharmaceutical avaluation og gelatin microcapsules of severel oral antibiotics”, *Chem. Pharm. Bull.*, 3,1, (1983), 269-273.
154. Bigi, A., S. Panzavolta and K. Rubini, 2004. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25: 5675-5680
155. Stainer P., Moore G.E.: Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non- syndromic clefts. *Human Molecular Genetics* 13, Review Issue 1,2004.
156. C. A. Simmons, E. Alsberg, S. Hsiong, W. J. Kim, and D. J. Mooney Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo

- bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35 (2004) 562– 569
157. Patel, Z.S. , Masaya Yamamoto , Hiroki Ueda , Yasuhiko Tabata , Antonios G. Mikos, “Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2”, *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1126–1138
158. Lu M., Rabie A.B.M.: Quantitative assessment of early healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts using micro-computed tomography and Qwin image analyzer. *Int J Oral Maxillofac. Surg.*, 2004; 33: 369-376
159. Aronin CEP, Sadik KW, Lay LA, Rion DB, Tholpady SS, Ogle RC, Botchwey EA. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds, *J Biomed Mater Res* 89A: 632–641, 2009
160. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 9: e36.
161. Walker N.J., A technique whose time has come. *Science*, 2002; 296: 557-559.
162. Kozo, O., et al., Quantitative study on osteoconduction of apatite-wollastonite containing glass ceramic granules, hydroxyapatite granules and alumina granules. *Biomaterials*, 1990. **11**(4): p. 265-271.
163. Chen, T.M., et al., Evaluation of a novel malleable, biodegradable osteoconductive composite in a rabbit cranial defect model. *Materials chemistry and physics*, 1998. **55**(1): p. 44-50.
164. Gomez B Jr, Ardakani S, Ju J, et al. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 1995;41:1560-6.
165. Chomczynski P, Sacchi N Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* Volume 162, Issue 1, April 1987, Pages 156-159

EK-1 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/1X

23 Şubat 2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 18.02.2010 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2010/2
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2010/7
KARAR NUMARASI	: 2010/7-4
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. İbrahim Vargel
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. İbrahim Vargel, Yrd. Doç. Dr. Tarık Çavuşoğlu
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Figen Özgür, İlyas İnci
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 84 adet Wistar Rat
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 36 ay

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Plastik ve Rekonstrüksiyon Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. İbrahim Vargel'in yürüttüğü olduğu 2010/7 dosya numaralı ve *"Damak Yarıklarının İn Situ Doku Mühendisliği ile Onarımı: Hayvan Modeli Yaratılması ve Farklı Rejimlerde Kontrollü Büyüme Faktörü Salan Biyobozunur Doku İskeleleri ile Onarım"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Ilakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı

EK-2 Dokudan RNA İzolasyon Protokolü

- 1- 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle veya mortar ile homojenize edilmiştir.
- 2- Homojenizasyon işlemine 1000 ul TriFast ile devam edilmiştir. Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TriFast hacminin %10'nu geçmemesine sağlanmıştır.
- 3- Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
- 4- 200 ul kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca vortekslenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.
- 5- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrılmıştır.
- 6- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır.
- 7- Başlangıçta kullanılan TriFast miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip vortekslenmiştir.
- 8- Örnekler 1.5 saat -20°C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atılmıştır.
- 9- DNA kontaminasyonunu engellemek için ug başına 5U DNaz, 300 ul Dnaz Buffer I (200mM Tris-HCL, 20mM MgCl₂, 500mM KCl) ve 400 ul DEPC'li su eklenerek 30 dakika 37°C'de bekletilmiştir.
- 10- Örneklerin üzerine 300 ul 25mM EDTA eklenmiştir ve 65°C 10 dakika bekletilmiştir.
- 11- 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılmıştır.
- 12- 1000 ul %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılmıştır.

13- Peletin üzerine tekrar 1000 ul %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılır.

14- Pelet kurumaya bırakılır. 30-50 ul DEPC'li su ile sulandırılır.

EK-3 Gen ifade düzeyi analizleri tablosu

7. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla otogreft grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	2,053	0,043
BSP	1,388	0,007
COL1	0,119	0,002
OC	0,127	0,028
SPARC	0,105	0,016
RUNX2	0,331	0,036

7. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla Skafold/boş jelatin grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	0,367	0,027
BSP	0,404	0,006
COL1	2,964	0,004
OC	0,781	0,009
SPARC	0,512	0,020
RUNX2	0,355	0,034

7. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla BMP-2 grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	0,497	0,009
BSP	1,283	0,015
COL1	4,611	0,000
OC	1,121	0,040
SPARC	0,943	0,030
RUNX2	0,261	0,000

7. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla TGF- β 3 / BMP-2 grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	0,085
ALP	0,776	0,002
BSP	3,732	0,027
COL1	4,257	0,000
OC	0,621	0,048
SPARC	0,051	0,003
RUNX2	0,492	0,045

21. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla otogreft grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	1,304	0.046
BSP	4,377	0,025
COL1	0,095	0,002
OC	2,060	0,007
SPARC	6,063	0,007
RUNX2	1,556	0,032

21. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla skafold / boş jelatin grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	0,647	0,046
BSP	0,057	0,007
COL1	0,998	0,030
OC	0,277	0,011
SPARC	0,069	0,027
RUNX2	0,082	0,006

21. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla BMP-2 grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	2,416	0,043
BSP	0,223	0,004
COL1	0,214	0,023
OC	0,021	0,008
SPARC	0,013	0,023
RUNX2	0,046	0,000

21. gün GAPDH, ALP, BSP, COL1, OC, SPARC ve RUNX2 genlerinin kontrol grubuyla TGF- β 3/BMP-2 grubu arasındaki gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	
ALP	8,619	0,013
BSP	4,477	0,017
COL1	2,775	0,014
OC	20,217	0,022
SPARC	4,699	0,009
RUNX2	2,297	0,029

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aybüke Alıcı

Doğum Yeri : ankaya / Ankara

Doğum Yılı : 1986

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lisans 2005-2009 Ankara Üniversitesi Biyoloji Bۆlümü

Yabancı Dil: İngilizce

