

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BONE MORFOJENETİK PROTEİN-6 ve İNSULİN  
BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-I'ın  
KONTROLLÜ ve ARDIŞIK SALIMININ  
SEMENTOBLAST HÜCRELERİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dt. Emel Tuğba ATAMAN**

**Periodontoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2014**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BONE MORFOJENETİK PROTEİN-6 ve İNSULİN  
BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-I'ın  
KONTROLLÜ ve ARDIŞIKSALIMININ  
SEMENTOBLAST HÜCRELERİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dt. Emel Tuğba ATAMAN**

**Periodontoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Rahime Meral NOHUTCU**

**ANKARA  
2014**

## ONAY SAYFASI

Anabilim Dalı :PERİODONTOLOJİ  
 Program :PERİODONTOLOJİ  
 Tez Başlığı :Bone Morfojenetik Protein-6 ve İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1'in kontrollü ve ardışık salımının sementoblast hücreleri üzerine etkileri  
 Öğrenci Adı-Soyadı :EMEL TUĞBA ATAMAN  
 Savunma Sınavı Tarihi :19.12.2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **PROF. DR. DİLEK İLHAN**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**

Tez danışmanı: **PROF. DR. RAHİME M. NOHUTCU**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**

Üye: **PROF. DR. ŞULE BULUT**  
**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

Üye: **PROF. DR. A. EZEL BERKER**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**

Üye: **PROF.DR.SEMA S. HAKKI**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

(İmza)

(İmza)

(İmza)

(İmza)

(İmza)

### ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



(İmza)

Prof.Dr. Ersin FADİLLİOĞLU

Müdür *γ*

## TEŞEKKÜR

Periodontoloji doktora eğitimim ve tez çalışmalarındaki katkılarından dolayı saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Rahime Meral Nohutcu'ya;

Periodontoloji eğitimime ve tez çalışmalarına katkılarından dolayı projenin yürütücüsü de olan sevgili Abdullah Cevdet Akman'a;

Tezimin tüm aşamalarında birlikte çalıştığımız Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden sevgili Anıl Çakmak'a;

Tez çalışmalarına katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na ve Tolga Demirtaş'a;

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşarak eğitimime katkıda bulunan ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili Dr. Burak Kutlu'ya;

Bu süreçte bilgilerini paylaşan ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm Periodontoloji Bölümü öğretim üyelerine;

Doktora eğitimimdeki büyük katkılarından dolayı bölümümüzden mezun olan kıdemli asistanlarım Dr. Sevim Günday'a, Dr. Erkan Şüküroğlu'na, Dr. Sezen Aşkın'a;

Berber çıktığımız bu yolda dostluğunu, desteğini hep hissettiğim canım arkadaşım Dr. Vuslat Çiçek Arı'ya;

Arkadaşlıklarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili Dr. Orkun Topçu'ya, Dr. Doğukan Yılmaz'a, Dr. Tolga Genç'e ve Dt. Burak Şahbazoğlu'na;

Desteklerini hep gördüğüm, güzel kalplerini benimle paylaşan sevgili Dt. Sahand Taheri'ye, Dt. Hazel Kocabaş'a ve Dt. Bünyamin Çalışan'a;

Doktora eğitimim süresince aynı odayı ve güzel anıları paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma;

Her zaman ve her durumda desteklerini gördüğüm canım aileme;

Hayatımı anlamlı kılan, her durumda yanımda olan ve olacağını bildiğim sevgili Dt. Onurcem Duruel'e

en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Ataman, E.T., Bone morfojenetik protein-6 ve insülin benzeri büyüme faktörü-I' in kontrollü ardışık salımının sementoblast hücreleri üzerine etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2014.** Periodontitis, dişi destekleyen dokuların yıkımına neden olan enfeksiyöz bir hastalıktır. Periodontal tedavilerin amacı, hastalığın başlamasına ve ilerlemesine neden olan lokal faktörleri uzaklaştırarak periodontal dokuları sağlıklı hale getirmektir. Geleneksel periodontal tedaviler, hastalığın ilerlemesini durdurmada başarılı olsa da, hastalık sonucu kaybedilen dokuların yeniden oluşumunun sağlanamadığı “tamir” tipi iyileşmeyle sonuçlanır. Periodontal rejenerasyon; hastalık sonucu kaybedilen alveol kemiği, periodontal ligament ve sementin yeniden oluşması olarak tanımlanır ve periodontal rejenerasyon oldukça karmaşık olaylar sürecini kapsamaktadır. Büyüme ve farklılaşma faktörleri hücrel fonksiyonları düzenleyen polipeptidlerdir. Bu faktörlerden bazıları hazırlayıcı (competence) faktörler olarak, bazıları da ilerletici (progression) faktörler olarak görev alarak hücre döngüsünün devamlılığını sağlarlar. Bu nedenle, hücre büyüme ve gelişme sürecinin devamlılığı için her iki grup faktörün bir arada olması istenir. Ancak, maliyetlerin yüksek olması ve kısa biyolojik yarı ömürleri nedeniyle hedef hücreler üzerindeki etkilerinin sınırlı kalması büyüme ve farklılaşma faktörlerinin klinikte yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle belirli taşıyıcılar kullanılarak büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrollü bir şekilde salımlarının sağlanması gerekmektedir. Kitosan, biyolojik olarak uyumlu ve yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilere sahip doğal bir polimerdir. Bu çalışmanın amacı, periodontal dokuların doğal iyileşme sürecine benzer olarak IGF-I ve BMP-6'nın kontrollü ve ardışık salımının sementoblast hücrelerinin rejeneratif potansiyelleri üzerindeki etkilerini araştırarak, periodontal doku mühendisliği için uygun doku iskelesi önerisinde bulunmaktadır. Kontrollü ve ardışık salımı sağlamak amacıyla kompozit yapı, üretilen IGF-I yüklü mikroküreler ve BMP-6 yüklü nanopartiküllerin kitosan doku iskelesine entegre edilmesiyle oluşturuldu. Salım kinetikleri belirlenen taşıyıcıların sementoblastlar üzerindeki etkileri değerlendirildi. Hücrelerin çoğalmalarını değerlendirmek amacıyla yapılan MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür) analizleri sonucunda 2, 4, 8 ve 12. günlerde hem IGF-I hem de BMP-6 içeren kompozit yapı grubunda kontrol gruplarına göre belirgin fark görüldü. Buna ek olarak, sementoblastların farklılaşmalarının ve mineralize doku oluşturma potansiyellerinin de kontrollü ve ardışık salımı sağlayan kompozit yapıda kontrol gruplarına göre artmış olduğu belirlendi. Sonuç olarak, üretilen kompozit yapının periodontal rejenerasyon uygulamaları için kontrollü ve ardışık salımı sağlayabilen uygun bir taşıyıcı olduğu ve doku mühendisliği uygulamaları için ümit verici olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: periodontal rejenerasyon, periodontal doku mühendisliği, mikroküre, nanopartikül, kitosan, sementoblast, IGF-I, BMP-6.

Bu araştırma 112S374 proje numarası ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Ataman, E.T., The effects of sequential and controlled release of IGF-I and BMP-6 on cementoblasts. Hacettepe University Institute of Health Sciences Ph.D. Thesis in Periodontology. Ankara, 2014.** Periodontitis is an infectious disease which causes loss of tooth supporting structures. The goal of periodontal therapy is to improve periodontal health by means of removal of local factors which initiate and progress periodontal infection. Conventional periodontal therapies can stop disease progression but often result in “repair” or scar formation, not reproducing the structures lost in the disease process. Periodontal regeneration is histologically defined as regeneration of tooth supporting structures including alveolar bone, periodontal ligament and cementum and it is a complicated process. Growth and differentiation factors (GDF) are polypeptides which regulate cell functions. These factors are known as competence or progression factors and they provide continuity of cell cycle. Therefore for continuity of cell growth process, these two group of factors are needed to act together. However, clinical use of growth factors have two shortcomes: cost and short biological half-life which limit their effects on cells regenerating the periodontium. Therefore by using scaffold systems, it is needed to provide their controlled release. Chitosan is a biocompatible natural polymer which has positive effects on wound healing. The goals of this study are to develop micro and nanoparticles loaded chitosan carriers for controlled and sequential delivery, to observe protein release kinetics of IGF-I (competence factor) and BMP-6 (progression factor) which are loaded into micro and nanoparticles and to test the effects of released factors on various cell functions and protein expression of cementoblasts. For sequential and controlled release of growth factors, composite structure was fabricated from being encapsulated IGF-I loaded microparticles and BMP-6 loaded nanoparticles in chitosan scaffold. After the characterisation of *in vitro* release kinetics, the effects of scaffolds on cementoblasts were determined. Cementoblast cell proliferation was measured with MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay. Depending on the results, both IGF-I and BMP-6 containing composite structures showed greater effects of MTT assay at 2, 4, 8, 12th days compared with control groups. In addition, cementoblasts differentiation and mineralized tissue formation potentials were also increased in composite structure, compared with control groups. As a conclusion, composite structure, composed of micro and nanoparticles and chitosan, is an appropriate scaffolds for periodontal regeneration applications via providing sequential and controlled release and have a promising future for tissue engineering approaches.

Key words: periodontal regeneration, periodontal tissue engineering, microparticle, nanoparticle, chitosan, cementoblast, IGF-I, BMP-6

This research was supported by TÜBİTAK with project number: 112S374.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Rejenerasyon	4
2.2 Doku Mühendisliği	4
2.3 Hücreler	5
2.3.1 Kemik iliği stroma hücreleri	7
2.3.2 Periost kaynaklı hücreler	7
2.3.3 Osteoblastlar	7
2.3.4 Periodontal ligament hücreleri	8
2.3.5 Sementoblastlar	8
2.4 Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri	10
2.4.1 İnsulin benzeri büyüme faktörü	12
2.4.2 Bone morfojenetik proteinler	14
2.5 Doku iskeleleri	15
2.5.1 Kitosan	16
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	20
3.1 Aljinat mikrokürelerin hazırlanması ve IGF-I ile yüklenmesi	20
3.2 Aljinat mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları	22
3.2.1 Boy ve boy dağılımlarının belirlenmesi	22
3.2.2 Şişme deneyleri	22
3.2.3 Biyobozunurluk çalışmaları	22
3.2.4 Fouier Transform Kızılötesi Spektrokopi (FTIR) analizi	22

3.3 PLGA nanopartiküllerin hazırlanması ve BMP-6 ile yüklenmesi	23
3.4 PLGA nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları	23
3.4.1 Partikül büyüklüğü ölçümü	23
3.4.2 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) analizi	23
3.4.3 FTIR analizi	23
3.5 <i>In vitro</i> salım çalışmaları	24
3.5.1 Aljinat mikrokürelerden BSA salımının incelenmesi	24
3.5.2 PLGA nanopartiküllerden BSA salımının incelenmesi	24
3.6 Kitosan doku iskelesi/Aljinat mikroküre/PLGA nanopartikül içeren Kompozit yapının oluşturulması	24
3.7 Hücre kültürü çalışmaları	25
3.7.1 Sementoblastların elde edilmesi	25
3.7.2 Hücre kültürü deney grupları	26
3.7.3 Hücre ekimi	26
3.7.4 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) analizi	27
3.7.5 Gen ifade seviyelerinin belirlenmesi	27
3.7.6 von Kossa boyaması	28
3.7.7 SEM analizi	29
3.8 İstatistiksel analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1 Aljinat mikrokürelerin hazırlanması	31
4.2 Aljinat mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları	31
4.2.1 Boy ve boy dağılımlarının belirlenmesi	31
4.2.2 Şişme deneyleri	32
4.2.3 Biyobozunurluk çalışmaları	33
4.2.4 FTIR analizi	34
4.3 PLGA nanopartiküllerin hazırlanması	35
4.4 PLGA nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları	36
4.4.1 Partikül büyüklüğü ölçümü	36
4.4.2 SEM analizi	36
4.4.3 FTIR analizi	37



4.5 <i>In vitro</i> salım alışmaları	38
4.5.1 Aljinat mikrokürelerden BSA salımının incelenmesi	38
4.5.2 PLGA nanopartiküllerden BSA salımının incelenmesi	38
4.6 Kitosan doku iskelesi/Aljinat mikroküre/PLGA nanopartikül içeren Kompozit yapının oluşturulması	39
4.7 Hücre kùltürü alışmaları	40
4.7.1 Hücre proliferasyonu	40
4.7.2 Gen ifade seviyelerinin belirlenmesi	41
4.7.3 Mineralizasyon	43
4.7.4 Hücre morfolojisi	45
5. TARTIşMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	67

## SİMGELELER ve KISALTMALAR

aFGF	Asidik fibroblast growth factor
ALP	Alkalen Fosfataz
bFGF	Bazik fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine serum albumin
BSP	Bone sialoprotein
CGF	Cement-derived growth factor
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
DMAB	didodesildimetilamonyumbromür
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Media
DMSO	dimetilsülfoksit
EDTA	etilendiamintetraasetikasit
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fouier Transform Infrared Spectroscopy
GDF	Growth and differentiation factor
IGF	İnsulin-like growth factor
IL	İnterleukin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PDL	Periodontal ligament
PGA	Poli (glikolik asit)
PLA	Poli (laktik asit)
PLGA	Poli (DL-laktik-co-glikolik asit)
PTHrP	Paratyroid hormone related protein
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-YL)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
OC-CM	İmmortalize sementoblast hücre serisi
OCN	Osteokalsin

OPN	Osteopontin
Runx-2	Runt-related transcription factor 2
SEM	Scanning electron microscope
TGF	Transforming growth factor
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelial growth factor

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.4.1	Büyüme faktörlerinin etki yolları	11
4.2.1	Aljinat mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri	31
4.2.2	Aljinat mikrokürelerin kuru (a) ve şişmiş (b) halleri (x4)	32
4.2.3	Aljinat mikrokürelerin şişme kinetiği	33
4.2.4	Aljinat mikrokürelerin biyobozunurluk çalışması kapsamında çekilen optik fotoğrafları	34
4.2.5	Aljinat mikrokürelerin BSA yüklenmeden önceki ve sonraki FTIR spektrumları	35
4.4.1	PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları	36
4.4.2	PLGA nanopartiküllerin SEM görüntüleri	37
4.4.3	PLGA nanopartiküllerin BSA yüklenmeden önceki ve sonraki FTIR spektrumları	37
4.5.1	Aljinat mikrokürelerden BSA'nın salım kinetiği	38
4.5.2	PLGA nanopartiküllerden BSA'nın salım kinetiği	39
4.6.1	Kitosan doku iskelesi (a) ve kompozit yapının SEM görüntüsü (b) (Yapı içerisindeki aljinat mikroküreler daire içerisinde alınmıştır. Büyütülmüş fotoğrafta ise yapıya katılan nanopartiküller görüntülenmiştir)	40
4.7.1	Sementoblast hücrelerinin MTT analizi	40
4.7.2	Kültürün 4. ve 12. günlerinde elde edilen (a) Tip-I kollajen, (b) Runt-related transcription factor 2 (runx2) ve (c) osteokalsin (OCN) gen ekspresyon seviyelerini gösteren RT-PCR analizi sonuçları.	42
4.7.3	Hücre kültürünün 8. ve 12. günlerine ait von Kossa analiz sonuçları. (a) Kitosan grubu, (b) Kitosan/Aljinat grubu, (c) Kitosan/PLGA grubu, (d) Kompozit yapı.	44
4.7.4	Hücre Kültürü Deneyleri-Morfoloji-SEM-2. gün.	46
4.7.5	Hücre Kültürü Deneyleri-Morfoloji-SEM-4. gün.	47
4.7.6	Hücre Kültürü Deneyleri-Morfoloji-SEM-8. gün.	48

4.7.7	Kompozit yapı içerisinde ekilmiş sementoblast hücrelerinin 8. gündeki SEM görüntüleri-enine kesit.	49
4.7.8	Kompozit yapı içerisinde ekilmiş sementoblast hücrelerinin 8. gündeki SEM görüntüleri- boyuna kesit.	50

## TABLOLAR

Tablo		Sayfa
3.1	Gereç ve yöntem/çalışma planı.	20
3.7.1	RT-PCR analizinde her bir gen için kullanılan primerlerin listesi	29

## 1. GİRİŞ

Periodontitis; dişeti, alveol kemiği, periodontal ligament ve sementten oluşan diş destek dokularının ilerleyici yıkımı ile karakterizedir ve tedavi edilmediğinde desteğini yitiren dişin kaybı söz konusudur (1, 2). Periodontitis, koroner arter hastalıkları, inme, diyabet gibi pek çok sistemik hastalıkla da ilişkilidir ve kalp krizi ya da diğer ciddi sistemik problemler için risk oluşturabilir (2-4). İlerleyen kemik yıkımını durdurmak ve iltihabı kontrol altına almak amacıyla bakteri plağı ve diştaşı eliminasyonunu takiben ideal ağız hijyeninin sağlanması başarılı bir periodontal tedavinin temel başlangıcı olmakla birlikte periodontal dokuların fonksiyonel rejenerasyonu ulaşılmak istenen nihai hedeftir (5, 6).

Son 150 yıldır periodontal hastalıkların teşhisi ve tedavisinde çok önemli bilgiler elde edilmiş olmasına karşın periodontitis tedavisinde ideal bir yaklaşım olan öngörülebilir doku rejenerasyonunun sağlanması günümüzde hala mümkün olamamaktadır. Geleneksel periodontal cerrahi tedavilerin sonucunda inflamasyonun çözülmesi, cep eliminasyonu, periodonsiyumun formunun ve yapısının kazanılması mümkün olabilmektedir (7). Bu tedavilerde hastalığın nedeni olan iltihabi durum ortadan kaldırılrsa da sert ve yumuşak dokulardaki yıkımda geri dönüşüm görülememektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri ile elde edilen bu iyileşme tipi "tamir" olarak isimlendirilir ve oluşan ataçman tipi daha çok uzun epiteliyal ataçman, sınırlı miktarda yeni bağ dokusu ataçmanı ve önemsiz düzeyde yeni sement içermektedir (8). Oluşan bu yapı kaybedilen dokuların morfolojik özelliklerine sahip olmadığı gibi, fizyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirebilecek nitelikleri de taşımamaktadır. Bu nedenle, "periodontal rejenerasyon", yani hastalık sonucu kaybedilen periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinin yeniden oluşturulması klinik olarak çok büyük önem taşımaktadır (9, 10). Özetlemek gerekirse, kaybedilen dokuların form ve fonksiyon olarak yeniden kazanılması anlamını taşıyan "rejenerasyon", aslında periodontal cerrahi tedavilerde ulaşılmak istenen temel hedef olmaktadır.

Periodontal rejenerasyonda, periodonsiyum; dişeti ve periodontal ligament gibi yumuşak, alveol kemiği ve sement gibi mineralize dokulardan oluştuğundan, sert ve yumuşak dokuları bünyesinde barındıran oldukça karmaşık bir yara iyileşme sürecinin gerçekteşmesi gerekmektedir (11). Periodontal rejenerasyonda; inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, osteoblastlar, sementoblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve bunlara ek olarak periodontal ligamentte ve alveol kemiğinde damarlar etrafındaki alanda bulunan, yüksek çoğalma ve farklılaşma potansiyellerine sahip farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri de rol alırlar. Yara iyileşmesinin tipinin belirlenmesinde, farklı tipte ve özelleşmiş hücrelerin; kendi aralarında, ekstrasellüler matris bileşenleriyle ve çeşitli aracı moleküller ile etkileşimleri önemli rol oynar (7, 12).

Periodontitis nedeniyle periodontal dokularda meydana gelen kayıplar sonucunda kişinin çiğneme ve konuşma gibi önemli fizyolojik aktivitelerinin etkinliği azalmakta ve bunların yarattığı estetik sorunlar yaşam kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Periodontal hasarların tedavisinde uygulanan yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda, kemik grefti ve bariyer membran olarak çeşitli biyomateryaller kullanılmakta ve elde edilen rejenerasyon sınırlı düzeyde kalmaktadır. Ayrıca, tedavi sonuçlarının öngörülebilirliği mümkün olmamaktadır. Kullanılan çeşitli seramik yapılı biyomateryaller kırılğan yapılı olduklarından özellikle yük taşıyan bölgelere uygulandıklarında tedavi başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir. Otojen kemik kullanımının ise elde edilebilecek doku miktarının sınırlı olması ve verici sahada yara iyileşme sürecinde komplikasyonlar ortaya çıkabilmesi gibi dezavantajları mevcuttur. Ayrıca, otojen kemik içerisinde yer alan canlı hücre sayısı oldukça sınırlıdır ve uygulama sonrası otojen greft içinde yer alan hücrelerin canlılıklarını koruma ve fonksiyon görme kapasiteleri de yeterli düzeyde değildir (13). Periodontal rejenerasyon hedefine yönelik güvenilir ve istikrarlı sonuçlara ulaştıracak tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi hastaların yaşam kalitesinin artırılmasını sağlayacaktır. Ek olarak, başarısız veya kısmi başarılı tedaviler sonrasında ortaya çıkan yeniden tedavi ihtiyacının ortadan kaldırılması ekonomik açıdan da önem arz etmektedir. Kemik hasarlarının giderilmesine



ve periodontal rejenerasyonu sağlamaya yönelik en mkemmел chzm “doku mühendisliği” olarak adlandırılan yaklaşımdır. Doku mühendisliği; zarar görmüş doku ve organların yenilenmesi için biyosinyal moleküller ve hücrelerle birlikte kullanılacak, hastaya özgü, uygun anatomik formda bir doku iskelesi oluşturulmasını hedeflemektedir. Periodontal rejenerasyon hedefine yönelik doku mühendisliği uygulamalarını kapsayan deneysel çalışmalarda periodontal ligament, sementoblast, periost kaynaklı hücreler ve kemik iliği stroma hücreleri kullanılmıştır (14). nc olarak nitelendirilebilecek bu çalışmalarda geliştirilen doku iskelelerine yüklenmiş büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrollü salımları gerçekleştirilerek, periodontal ligament, sement ve alveol kemiği rejenerasyonu sağlanmasına yönelik umut vaat eden başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Periodontal doku mühendisliği uygulamaları ile kaybedilen periodontal dokuların rejenerasyonunu sağlayabilecek etkili ve öngörülebilir tedavi yöntemleri geliştirilebilir. Bu görüşten yola çıkarak yapmış olduğumuz bu çalışmanın amacı; periodontal dokuların doğal iyileşme sürecine benzer olarak IGF-I ve BMP-6'nın hazırlanan mikroküreler ve nanopartiküllerden kontrollü ve ardışık salımının sementoblast hücrelerinin rejeneratif potansiyelleri üzerindeki etkilerini araştırarak, periodontal doku mühendisliği için uygun olabilecek doku iskelesi önerisinde bulunmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Periodontitis; dişi destekleyen dokularda, özgül mikroorganizmalar veya özgül mikroorganizma gruplarının etkisiyle oluşan iltihap sonucu cep oluşumu ve/veya dişeti çekilmesiyle birlikte görülen periodontal ligament ve alveol kemiğinin ilerleyen yıkımıyla seyreden bir hastalıktır (15).

Geleneksel periodontal cerrahi tedaviler sonucunda inflamasyonun çözülmesi, cep eliminasyonu ve periodonsiyumun formunun ve yapısının geliştirilmesi sağlanmakla birlikte genellikle iyileşme tipi “rejenerasyon” değil, “tamir” olarak gerçekleşmektedir (7). Bu iyileşme tipinde oluşan ataçman daha çok uzun epiteliyal ataçman, az düzeyde yeni bağ dokusu ataçmanı ve önemsiz düzeyde sementten oluşmaktadır (8). Oluşan yeni yapı yani skar dokusu, kaybedilen dokuların morfolojik özelliklerine ve fizyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirebilecek kapasiteye sahip değildir (16). Bu nedenle günümüz periodontal tedavilerinin asıl hedefi, periodontal hastalık sonucu kaybedilen alveol kemiği, periodontal ligament ve sementin form ve fonksiyon olarak tam bir rejenerasyonunun sağlanmasıdır (9, 10).

### 2.1 Rejenerasyon

Gerçek periodontal rejenerasyon, periodontal hastalık sonucu etkilenmiş kök yüzeyinde yeni sement ve alveol kemiği ile birlikte, bu iki yapı arasında uzanan düzenli kollajen fibrillerine sahip periodontal ligamentin de yeniden oluşumudur (17). Ancak periodonsiyumun farklı tipte dokulardan oluşması ve çeşitli çevresel faktörlerin de etkisiyle periodontal cerrahi sonrası görülen yara iyileşmesi oldukça karmaşık bir süreci kapsamaktadır.

### 2.2 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; sentetik veya biyolojik matrisler içerisinde canlı hücrelerin, biyolojik aracı moleküllerin ve büyüme faktörlerinin birlikte bulunduğu yapıların hastalara yerleştirilmesiyle hastalık ya da travma sonucu kaybedilen veya hasara uğramış dokuların yeniden oluşturulmasını hedeflemektedir (18). Doku mühendisliği uygulamaları kapsamında dokuların

rejenerasyonu için uygun hücrelere, biyolojik sinyallere, kanlanmaya ve doku iskelesinin varlığına gereksinim duyulmaktadır (19). Hücreler çoğalarak ve farklılaşarak kaybedilen dokuların yeniden oluşmasını sağlarlar. Büyüme ve farklılaşma faktörleri ise, hücreleri uyararak fonksiyonlarını düzenlerler. Anjiyojenik sinyallerle uyarılan yeni damarsal ağların oluşması ise oluşan dokunun beslenmesine ve dengelenmesine katkıda bulunur. Son aşamada da doku iskeleleri yeni oluşacak dokunun formunu belirleyecek üç boyutlu geçici yapıyı oluştururlar.

Doku mühendisliği uygulamaları ile vücut içine yerleştirilen yapılar vücudun geri kalan doğal dokuları gibi fiziksel ve biyolojik uyarılara ve değişimlere karşı cevap vererek uyum gösterebilir. Bu özellik doku mühendisliği ile oluşturulan yapıların canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamalarına kıyasla en önemli üstünlüğüdür. Canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamaları doku içerisinde zamanla yıkıma uğrayıp fiziksel niteliklerini kaybedebilirlerken, doku mühendisliği uygulamaları ile elde edilen yapılar dış etkenlere ve fizyolojik gereksinimlere yanıt vererek istenilen niteliklerini koruyabilirler (20).

Doku mühendisliği uygulamalarının temel elemanları:

- 1) Hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip hücreler,
- 2) Hücrelerin fonksiyonlarını destekleyen veya yönlendiren büyüme ve farklılaşma faktörleri,
- 3) Hücreler ve büyüme/farklılaşma faktörlerinin içinde yer aldığı, oluşturulması hedeflenen dokunun üç boyutlu yapısını belirleyen doku iskelesidir.

### **2.3 Hücreler**

Doku mühendisliği çalışmaları kapsamında, doğru hücrelerin seçilmesi başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri olmaktadır. Hücreler kaynaklarına göre 3'e ayrılmaktadır. Bunlar; hastanın kendi dokularından elde edilen; otolog, başka bir insandan elde edilen; allojenik ve başka bir

canlı türünden elde edilen; ksenojenik hücrelerdir. Hücrelerin etkinliğini sürdürebilmesi, immun yanıt gelişme riskinin olmaması gibi avantajlara sahip olan otolog hücreler kullanım açısından ön plana çıkmaktadır (21).

Doku mühendisliğinde kullanılacak hücrelerin belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler; kolay elde edilebilme, *in vitro* ortamda kolay çoğaltılabilme, immun yanıt geliştirme riskinin olmaması ve geliştirilmek istenen doku ile benzer protein ekspresyonlarına sahip olabilme nitelikleridir (22).

Doku mühendisliği uygulamalarında amaç kemik oluşturmak olduğunda, immunojenik olmamaları ve biyopsi ile elde edilebilirliklerinin kolay olması gibi avantajları olan osteoblastlar ön plana çıkmaktadır. Ancak, elde edilen osteoblastların az sayıda olması ve çoğaltılmalarının zor olması doku iskelesine bu hücrelerin taşınabilmesini olumsuz etkilemektedir. Bu problemi aşmak amacıyla farklı hayvanların kullanımının söz konusu olduğu yöntemler geliştirilerek daha fazla sayıda osteoblast üretimi sağlanmış, fakat bu yöntemlerle immun yanıt gelişme veya hastalıkların aktarılması gibi riskler de ortaya çıkmıştır (22).

Son yıllarda bu kapsamda yapılan çalışmalarda kök hücrelerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri olan embriyonik kök hücre ya da erişkin kök hücreler kullanılmaya başlanmıştır. Embriyonik kök hücrelerin kullanımı, uygulamalardaki bir takım problemler etik sorunlar nedeniyle etik kurullar tarafından durdurulmuştur. Kemik dokusu oluşturulması planlanan doku mühendisliği çalışmalarında farklılaşmaları yönlendirilebilen, kolay çoğaltılabilen, kemik iliği, kas, dermis, yağ ve periferik kan dokusundan elde edilebilen mezenşimal kök hücreler sıklıkla kullanılmaktadır (22-25).

Doku mühendisliği uygulamaları kapsamında kök hücreler başta olmak üzere beklenen özelliklere sahip çeşitli hücre gruplarının kullanımı halihazırda mevcuttur.

### 2.3.1 Kemik iliği stroma hücreleri

Kemik iliği stroma hücreleri, kemik iliği mononükleer hücrelerinin bir alt grubudur ve kemik iliği aspirasyon materyallerinden izole edilebilirler. Bu hücreler fenotipik özellikleri ve fonksiyonları bakımından heterojen bir hücre grubundan oluştuklarından; kemik, kas, yağ ve diğer bağ dokusu yapılarının rejenerasyonunda rol oynamaktadırlar (23).

Kemik iliği stroma hücrelerinin, düşük düzeyde immun yanıt oluşturdıkları bildirilmiştir. Ancak, kemik iliğinden elde edilen yüz bin hücreden sadece bir tanesinin kök hücre olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle söz konusu hücrelerin *in vitro* olarak uygun sitokin ya da diğer faktörlerle muamele edilerek hedef hücre sayısının artırılması gerekmektedir. Ayrıca yaşlı bireylerden elde edilen hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyellerinde azalma görülebilmektedir (22).

### 2.3.2 Periost kaynaklı hücreler

Periost içerisinde yer alan hücreler, gelişim döneminde ve travmalarda kemik dokusunun oluşturulmasında rol almaktadırlar (26). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda periosteal hücrelerin ektopik alanlarda kıkırdak ve kemik oluşturabilme kapasitelerinin bulunduğu gösterilmiştir (27, 28). Ayrıca periost hücrelerinin bone morfojenetik proteinler (Bone morphogenetic protein; BMP) ile uyarıldıklarında osteojenik belirteç düzeylerinde artış meydana geldiği bildirilmiştir (27, 28).

### 2.3.3 Osteoblastlar

Mezenşimal kaynaklı hücre grubu olan osteoblastlar, kemik metabolizmasıyla ilgili temel hücrelerdir. Kemik organik matrisini sentezlerler ve sahip oldukları alkalen fosfataz (ALP) sayesinde mineralizasyonda görev alırlar (29). Ayrıca, dolaşımda bulunan hormon, büyüme faktörleri veya fiziksel uyarımlar etkisiyle salgılanan sitokinler ile yönlendirilen mekanizmalarla kemik dokusunun yapım, yıkım ve yeniden şekillendirilmesinde rol alırlar. Osteoblastlar, kemik yapım ve yıkım

olaylarının düzenlenmesindeki rolleri ile kalsiyum, fosfat gibi minerallerin kan düzeylerinin düzenlenmesinde de görev alırlar (30). Kemiğin yeniden şekillenme sürecinin durmasıyla inaktif olan bu hücreler ekstraselüler matris oluşturarak oluşturdukları matris içerisine gömülürler ve osteosit hücrelerine dönüşürler (31). Ek olarak kemik rejenerasyonu ile ilgili BMP, transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor/TGF)- $\beta$ , insülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor/IGF)-I, IGF-II, interlökin (IL)-1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor/PDGF) gibi sinyal proteinlerini de salgılamaktadırlar (32, 33).

#### **2.3.4 Periodontal ligament hücreleri**

Periodontal ligament (PDL) hücreleri PDL yapılarını sentezleyebilmesi ile periodontal rejenerasyonda önemli rol oynayan, temel olarak fibroblast yapılı hücrelerden oluşan, fakat çoğalma, morfoloji ve protein ekspresyonları gibi özellikleri bakımından da diş eti fibroblastlarından farklılık gösteren heterojen hücre topluluğudur (34-38). PDL hücreleri farklılaşarak sement ve kemik dokusu oluşturma potansiyeline sahiptir (34-36). Yapılan çalışmalarda PDL hücrelerinin heterojen yapıya sahip olmaları ve yüksek çoğalma/farklılaşma yetisine sahip erişkin kök hücrelerin de periodontal ligamentte bulunması nedeniyle bu potansiyele sahip olabilecekleri ileri sürülmüştür (39, 40).

Wolf ve diğ. (41) immunojenik olarak baskılanmış ratları kullanarak yapmış oldukları *in vivo* çalışmada, kollajen sünger taşıyıcı kullanarak osteojenik olarak farklılaşmamış PDL hücrelerini subkütan olarak ratlara uygulamışlardır. Çalışmada 28. gün sonunda yapılan immunohistokimyasal incelemelerle hücrelerde osteojenik ve sementojenik protein ekspresyonlarının varlığı gösterilmiştir.

#### **2.3.5 Sementoblastlar**

Sement, dentin ile bağlantılı olarak bulunan, diş köklerinin dış yüzeyini saran, üretimi sementoblastlar tarafından gerçekleştirilen ve yaşam boyu sentezlenebilen mineralize bir dokudur (42). Aktif olarak matris sentezi yapan

sementoblastların morfolojileri osteoblastlara benzemektedir (30). Tip I kollajen, osteopontin (OPN), osteokalsin (OCN) ve bone sialoprotein (BSP) gibi polipeptid yapıların sentezine katılırlar (43, 44). Sementoblastlar sement içerisine gömülü olan Sharpey lifleri dışındaki kollajen liflerin, fibrillerde mevcut bulunan glikoproteinlerin, fosfoproteinlerin ve proteoglikanların sentezinde de görev alırlar (45). Sementoblastların mineralize matris içerisine gömülerek dönüştükleri sementositler düşük seviyelerde matris sentezi yaparlar ve osteositlere benzer özellikler sergilerler (30). Sementin yapısını % 50 oranında hidroksiapatitler, % 50 oranında kollajen ve kollajen dışı proteinler oluşturmaktadır (46). Sement dokusu her ne kadar kemik dokusuna benzer özelliklerde olsa da damarsız yapısıyla, remodelasyonun sınırlı olması hatta hiç yeniden yapılanma göstermemesiyle ve sinirsel uyarım sisteminin bulunmamasıyla bu dokudan farklılık göstermektedir (47).

Jin ve diğ. (48) yapmış oldukları bir çalışmada, sementoblast, PDL hücreleri veya dental folikül hücrelerini içeren poli(DL-laktik-co-glikolik asit) (PLGA) blok şeklindeki doku iskeleleri subkütanöz olarak ratlara yerleştirmiş ve ratlar üçüncü ve altıncı haftalarda sakrifiye edilerek incelenmiştir. Yapılan histolojik incelemelerde üçüncü haftada sadece sementoblastları içeren PLGA taşıyıcılarda mineral oluşumuna rastlanmış ve bu mineralize alanın altıncı haftada artmış olduğu bildirilmiştir. Gen ifade seviyelerine bakıldığında, OCN ifade seviyesinin de sadece sementoblast içeren PLGA taşıyıcılarda görüldüğü kaydedilmiştir. Zhao ve diğ. (49) yapmış oldukları bir çalışmada, atimik ratların alt birinci molarlarının distal köklerinin bukkal yüzeylerinde kemik defektleri oluşturarak ratları 3 gruba ayırmışlardır. Gruplardan birine kontrol grubu olacak şekilde sadece PLGA polimer sünger taşıyıcı, diğerine immortalize rat sementoblastları içeren PLGA polimer sünger ve son gruba da dental folikül hücreleri içeren PLGA polimer sünger yerleştirilmiştir. Üçüncü ve altıncı haftalarda hayvanlar sakrifiye edilerek histolojik incelemeler ve *in situ* hibridizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Histolojik incelemelerde kontrol grubunda ve dental folikül içeren PLGA grubunda defekt alanında fibröz doku oluşumu izlenirken, sementoblast içeren PLGA grubunda mineralize doku oluşumu gözlenmiştir. *In situ*

hibridizasyon analizinde ise sementoblast içeren PLGA grubunda oluşan mineralize dokunun BSP ve OCN genleri için diğer gruplara kıyasla daha güçlü sinyaller oluşturduğu bildirilmiştir.

## 2.4 Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri

Büyüme faktörleri, hücrelerin büyümelerini ve/veya farklılaşmalarını çeşitli yollarla etkileyen polipeptid yapılı proteinler olarak tanımlanabilir (50, 51). Farklılaşma faktörleri ise, tıpkı büyüme faktörleri gibi işlev görürken aynı zamanda hücrenin fenotipik karakterini kontrol eden öncü hücrelerin olgunlaşmış hücrelere dönüşmesini sağlarlar (52, 53). Büyüme ve farklılaşma faktörleri kısmen veya tamamen inaktif öncü moleküller olarak ortamda bulunurlar ve proteolitik mekanizmalarla aktif hale gelirler. Büyüme ve farklılaşma faktörleri hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlandıktan sonra protein kinazları aktive ederek hücre içi sinyal yolunu başlatıp etkilerini göstermektedirler (54).

Büyüme ve farklılaşma faktörleri çoğalmayı, farklılaşmayı, migrasyonları, protein sentezlerini ve/veya ataçman özelliklerini artırarak veya azaltarak ve morfolojik özelliklerini değiştirerek hücreleri etkileyebilmektedir (39, 55). Büyüme ve farklılaşma faktörleri hücreye yakınlıklarına göre sınıflandırılmaktadır (51) [Şekil 2.4.1]:

Endokrin: Büyüme/farklılaşma faktörü hedef hücreye uzak bulunmaktadır. Faktör kan yolu ile hedef bölgeye taşınır.

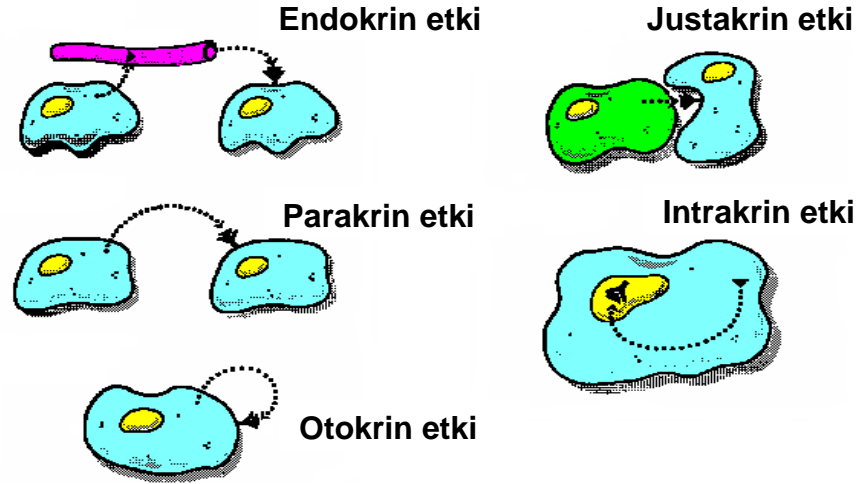
Parakrin: Büyüme/farklılaşma faktörü hedef hücreye yakın bulunmaktadır. Faktörün salındığı hücrelerin etrafındaki farklı hücreler etkilenir.

Otokrin: Hedef hücre aynı zamanda büyüme faktörünün salındığı hücredir.

Jukstakrin: Büyüme faktörleri salgılandıkları hücre zarına bağlanarak komşu hücreyi etkilerler.



Intrakrin: Büyüme faktörünün salgılanmadan, aynı hücre içinde etki göstermesi.



Şekil 2.4.1 Büyüme faktörlerinin etki yolları

Günümüzde, hücre döngüsünde DNA sentezi ve hücre bölünmesinin nasıl düzenlendiği net ve detaylı olarak bilinmektedir (56). Erişkin dokularda hücrelerin çoğu G0 fazı olarak adlandırılan bölünmeyen (Quiscent) durumundadır. Bölünen hücreler interfaz (G1, S, G2) ve M fazından geçerler. G0 durumundaki hücrelerin G1 fazına geçmesi bir takım özel olaylar gerektirmektedir. Bu olaylar hücreyi DNA sentezine yönlendirir ve bu safha "restriction point" (R) olarak bilinmektedir. Bölünmekte olan bir hücrenin G1, G2, M fazlarına geçmesinde belli düzenleme noktaları mevcuttur (57, 58). Bu düzenlemelerin bazıları protein fosforilasyonunu içerir. Protein kinazların hücre döngüsünün S ve M fazlarının kontrolünde rol aldığı da bilinmektedir (54). Çeşitli büyüme faktörleri G0/G1'de hazırlayıcı (competence) ve/veya ilerletici (progression) faktör olarak rol oynayarak hücrelerin bölünmeyen durumdan bölünme durumuna geçmesini kontrol ederler. Örneğin, PDGF gibi hazırlayıcı (competence) faktörler, hücrenin G0 fazından G1 fazına geçişini

sağlayarak etkisini gösterirken, IGF gibi ilerletici (progression) faktörler, hücre döngüsünün devam etmesini sağlayarak işlev görürler (54). Bu nedenle, hücre büyüme ve gelişme sürecinin devamlılığı için her iki grup faktörün bir arada olması istenir.

Çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörü tanımlanmış, karakterize edilip yapısal benzerliklerine göre sınıflandırılmışlardır (51). Ek olarak çok sayıda büyüme faktörü rekombinant teknolojiler kullanılarak üretilmiş ve böylelikle deneysel ve klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanımları mümkün olabilmektedir (59).

Büyüme faktörleri doku mühendisliğinde farklı uygulama şekillerine sahiptir. Direkt olarak doku iskelesinin yapısına katılarak, doku iskelesine dışarıdan uygulanarak, büyüme faktörünün doğal olarak sentezlendiği ya da genetik modifikasyonlu hücrelerle uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Büyüme faktörlerinin, polimer yapılı doku iskelelerinin yapısına katıldığı uygulama şeklinde biyolojik etkilerinin daha uzun süreli olduğu ve ek olarak kontrollü salımlarının sağlandığı da bilinmektedir (51).

Periodontal dokuların tamir ve rejenerasyonunda görev alan ve hücre fonksiyonlarını düzenleyen büyüme faktörleri; kemik, sement ve bağ dokusu oluşumunu etkilemektedir (60). PDGF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), TGF- $\beta$ , asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), IGF, sement kaynaklı büyüme faktörü (cementum-derived growth factor; CGF), paratiroid hormonla ilişkili protein (parathyroid hormone-related protein; PTHrP) ve BMP periodontal dokularda varlığı gösterilmiş büyüme faktörleridir (50).

#### **2.4.1 İnsulin benzeri Büyüme Faktörü**

Kemik matrisinde en fazla bulunan büyüme faktörü olan IGF, amino asit dizilimi insan proinsulinine benzediğinden bu adı almıştır. IGF'nin 70 amino asitlik IGF-I ve 67 amino asitlik IGF-II olarak iki farklı alt grubu vardır (61). Embriyogenez sırasında organogenezi ve büyümeyi artırmalarının yanı sıra gelişimin ileriki safhalarında spesifik doku ve organ fonksiyonlarını da

düzenlerler (62). IGF-I'in kemik formasyonuna ve hücresele olaylara etkisi IGF-II'den daha fazla olduğundan genel olarak çalışmalarda IGF-I kullanılmaktadır (63).

IGF-I tek zincirli bir polipeptid hormondur. Hem osteoblastların büyümesini hem de pre-osteoblastların osteoblastlara farklılaşmasını sağlayarak kemik hücre metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (64, 65). IGF-I hücreler arası matris sentezini, kemik yapımını ve büyümesini artırırken, kemik rezorpsiyonunu da artırır (62, 64). Ayrıca IGF-I programlı hücre ölümünü inhibe eder. IGF-I'in ek olarak osteoblastlardan tip-I kollajen salınımını artırdığı bildirilmiştir (65). Vasküler endotelial hücreler için kemotaktik ajandır ve damarlanmayı artırır. Fibroblast, osteosit ve kondrositlerin *in vitro* olarak mitozunu aktive eder (60). İnsan PDL fibroblastlarının çoğalmasını doz ve zamana bağlı olarak artırdığı ancak, hücre yapışmasını, göçünü ve tip-I kollajen ifade seviyelerini etkilemediği gösterilmiştir (66). IGF-I aynı zamanda sementoblast bölünmesini, fenotipik gen ifade seviyelerini ve mineralizasyonunu da olumlu yönde etkilemektedir (62).

IGF-I, hem lokal etki hem de sistemik dolaşıma katılarak endokrin etki gösterebilmektedir. Dolaşımda bulunan IGF-I'in kaynağı büyük ölçüde karaciğer dokusuyken, osteoblastlar ve trombositler başta olmak üzere, keratinosit, fibroblast, makrofaj ve monosit gibi hücreler aracılığıyla da üretilebilmektedirler. Dolaşımda mevcut olan IGF-I'in hücresele seviyedeki anabolik etkileri sadece protein sentezini artırmakla sınırlı olmamakta, periferel hücrelerde glikoz alımını ve glikojen sentezini sağlamak, nöronların yaşam sürelerini, miyelin sentezini ve kemik rejenerasyonunu artırmak gibi görevleri de üstlenmektedir (67).

Saygın ve diğ. (68) sementoblastları kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada, IGF-I ile muamele edilmiş sementoblastlarda artan oranlarda çoğalma ve BSP gen ekspresyonunu bildirirken, OPN ve OCN gen ekspresyonunun etkilenmediğini rapor etmişlerdir.

Matsuda ve diğ. (69) yapmış oldukları bir çalışmada, PDL hücrelerini kullanarak IGF-I'in bu hücrelerin çoğalmasını ve kemotaksisini artırdığını bildirilmişlerdir.

#### 2.4.2 Bone Morfojenetik Proteinler

BMP'ler yapısal özellikleri bakımından TGF- $\beta$  ailesinde yer alan 20'den fazla farklı protein grubudur (60, 70, 71). BMP'ler amino asit dizilerindeki benzerliklerine göre kendi içlerinde 4 alt grupta sınıflandırılabilirler. BMP-2 ve BMP-4 % 80 oranında benzer amino asit dizisine sahip olarak aynı grupta yer almaktadırlar. İkinci grup BMP-5, -6, -7, -8a ve -8b'den oluşmaktadır (% 78 homoloji). Üçüncü grubu büyüme ve farklılaşma faktörü (Growth and differentiation factor-GDF) -5, -6, -7 oluştururken, dördüncü grubu ise diğer bütün BMP'lerden farklı yapıya sahip olan BMP-3 ve BMP-3B (GDF-10) oluşturmaktadır (71, 72). BMP'lerin kemik, kıkırdak gibi mineralize dokuların gelişiminin yanı sıra embriyonik ve fetal gelişimde, böbrek ve kalp gibi organların oluşum süreci üzerinde de etkileri mevcuttur.

BMP'lerin kemik ve kıkırdak dokularının gelişim ve rejenerasyonlarının farklı aşamalarında belirgin etkileri vardır (73). Kemik üzerindeki etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- 1) Farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve osteoprojenitör hücrelerin çoğalmasını ve osteoblastlara farklılaşmalarını sağlar.
- 2) Osteoblast hücrelerinin ALP ekspresyonunu artırır.
- 3) Mezenşimal hücreler için kemoatraktandır ve bu hücrelerin tip-IV kollajene bağlanmalarını artırır (60).

BMP'ler PDL gelişiminde de rol almaktadır ve oral kemik gelişimini stimüle ederler (74). Ripamonti ve diğ. (75)'nin yaptığı bir çalışmada primatlarda deneysel periodontal defektler oluşturulmuş ve oluşturulan bu defektlerde BMP'lerin kullanılmasının kemik ve sement rejenerasyonunu artırdığı kaydedilmiştir. Ek olarak, BMP'lerin yeni Sharpey liflerinin oluşmasını sağladığı da bildirilmiştir.

BMP-6, BMP ailesinin diğer üyelerine göre daha az araştırılmış olmakla birlikte, yapılan çalışmalar BMP-6'nın kemik oluşumunu artırdığını ve BMP-2 ve BMP-4'e göre osteoblast farklılaşmasını 2-2,5 kat daha fazla indüklediğini göstermektedir (76). Ayrıca BMP-6'nın osteoprogenitör hücre farklılaşmasının erken safhasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (77). BMP-6'nın mezenşimal farklılaşma boyunca osteoindüktif faktör olarak görev aldığı da bilinmektedir (78). Periodontal yara iyileşmesiyle ilgili, BMP-6'nın kullanıldığı kısıtlı sayıda çalışma olmakla birlikte yapılan çalışmalar periodontal rejenerasyonu artırdığını göstermektedir (79, 80).

## 2.5 Doku İskeleleri

Doku iskeleleri hücreler ve büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi doku mühendisliği çalışmalarındaki önemli elemanlardan biridir. Doku iskeleleri üç boyutlu yapı oluşturarak elde edilecek hedef dokunun formunu belirler, hücrelere fiziksel destek oluşturur ve hücrelerin tutunarak fonksiyon görmelerini sağlar. Bunun yanı sıra doku iskeleleri su, büyüme faktörleri, sitokinler ve besinler için kaynak oluşturur (22, 81).

İdeal doku iskeleleri uygulandıkları konak doku ile uyumlu olup, istenilen biyolojik etkileri sağlamalıdır. Kimyasal özellikleri dokuda toksik etki yaratmamalı, dokular için immunojenik olmamalıdır. Doku iskeleleri dokunun oluşumu ve vaskülarizasyonu için uygun yapı oluşturması, büyüme ve farklılaşma faktörleri için rezervuar görevi görmesi açısından gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır. Ancak, artan gözeneklilik yapının mekanik özelliklerini de zayıflatacağından, doku iskelelerinin gözenekli yapısının çok iyi ayarlanması gerekmektedir (22). Yapılan çalışmalarla doku mühendisliği uygulamalarında ideal gözenek boyutunun 100-150 µm arasında olması gerektiği bildirilmiştir (21). Doku iskelelerinin yüzey özellikleri de hücrelerin tutunmasını ve çoğalmalarını etkilemektedir. Hücrelerin tutunabilmesi açısından pürüzlü yüzeylerin düzgün yüzeylere göre daha uygun olduğu ileri sürülmüştür (22). Yapılan *in vivo* uygulamalar için doku iskelesinin mekanik

özelliklerinin hedef dokuya benzer olması gerekmektedir. Ek olarak doku iskelesi yapısının biyobozunurluğunun da geliştirilmek istenen dokunun oluşum hızına paralel olması beklenmektedir (21). Büyüme ve farklılaşma faktörlerinin yarılanma sürelerinin kısa olması kullanılacak doku iskelelerinin yapısal ve kimyasal özelliklerinin de buna uygun olmasını gerektirmektedir. Kullanılan ideal doku iskelesiyle büyüme ve farklılaşma faktörlerinin biyolojik aktiviteleri korunabilir. Tüm bu özelliklere ek olarak büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrollü salımını sağlayan doku iskeleleriyle faktörlerin daha düşük miktarlarda kullanımı ile doku için beklenen etkiler sağlanmış olur.

Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri sentetik ve doğal malzemeler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sentetik malzemeler grubunu seramikler (hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat), polimerler (polilaktid, poliglikolid, polilakid-glikolik) ve biyoaktif camlar (silika) oluştururken, doğal malzemeler grubunda kollajen, glikozaminoglikanlar, hyaluronik asit, aljinat ve kitosan bulunmaktadır (82, 83).

Doğal materyallerden oluşan doku iskelelerinin doku uyumları iyi olduğundan herhangi bir toksisiteye veya kronik inflamasyona neden olmazlar. Fakat, bu avantajları yanında yapısal dayanıklılıklarının zayıf olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (22).

Sentetik malzemeler farklı formlarda hazırlanabilirler ve yapısal dayanıklılıklarını doğal malzemelere göre daha uzun süreler koruyabilirler. Buna rağmen, biyolojik özellikleri hücrelerin ataçmanı ve çoğalması için yetersiz kalabilir ve bozunma hızları değişken olmaktadır. Ek olarak uygulandıkları bölgelerdeki çevre dokularla bütünleşmesi ve uyumu tam olarak sağlanamayabilir (22, 84).

### **2.5.1 Kitosan**

Kitosan, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen organik bir kopolimerdir. Kitin, doğada selulozdan sonra en çok bulunan bir protein olup, deniz kabuklularının ve mantarların hücre duvarında mevcuttur. Kitosan,  $\beta(1-4)$ glukozamin (2-amino-2-deoksi-D-glukoz) ve N-asetil-D-glukozamin(2-

asetamido-2-deoksi-D-glukoz) bağlanmasıyla oluşur ve molekül ağırlığı 50-2000 kDa arasında değişmektedir. Ticari olarak % 50 ile % 90 arasında değişen deasetilasyon derecelerine sahip formları bulunmaktadır. Partikül büyüklüğü 30 µm'den küçük ve pH değeri 6,5-7,5'tur. Suda ve bazik ortamda çözünmezken organik asit içerisinde inorganik asitlerden daha iyi çözünürlüğe sahiptir. Bu pH bağımlı çözünürlük, ılımlı koşullarda kitosana kolay işlenebilme özelliği sağlamaktadır. Kitosanın doku içerisinde yıkımı temel olarak lizozim tarafından sağlanmaktadır (85, 86).

Kitosan immunolojik yanıt oluşturmayan, toksik olmayan, biyoabsorbe olabilen ve çok çeşitli biyolojik etkilere sahip organik bir bileşiktir. Muzzarelli ve diğ. (87) yapmış oldukları bir çalışmada yara iyileşmesinde kitosanın dokunun stabilitesini ve yapısını desteklediğini ve üç boyutlu bir iskele görevi gördüğünü rapor etmişlerdir. Lahiji ve diğ. (88) yapmış oldukları bir çalışmada osteoblastların kitosan kaplı plastik yüzeylerde canlılıklarını % 90 oranında koruduklarını, hücre morfolojisini ve fonksiyonlarını sürdürdüklerini bildirmişlerdir. Ek olarak kitosanın yara iyileşme sürecindeki olumlu etkilerinden biri de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi önemli periodontopatojenlerin ve *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus aureus* gibi mikroorganizmaların üzerinde inhibe edici yani antibakteriyel özelliğinin olmasıdır (89-91). Kitosan; dokular üzerinde toksik etki yaratmaması, biyoabsorbe olabilirliği ve özellikle mukozal yüzeylere iyi tutunabilen bir madde olması nedeniyle kontrollü salım sistemleri için ideal bir ajandır (90, 92).

Klokkevold ve diğ. (93) farelerden elde edilen kök hücre kültürlerine asetik asitte çözünerek uygulanan 2 mg/ml'lik kitosanın, kontrol grubuna göre iki kat daha fazla mineralize yapı oluşumunu sağladığını göstermişlerdir.

Akman ve diğ. (94) yapmış oldukları bir çalışma ile, bFGF yüklü HA-kitosan doku iskelesinin üç boyutlu gözenekli yapısıyla PDL ve sementoblast hücrelerinin mineralizasyonunu, çoğalmasını ve hücre dışı matris sentezini desteklediğini göstermişlerdir.

Yılıgör ve diğ. (95) fare kemik iliği mezenşimal kök hücrelerini kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada geliştirdikleri üç boyutlu fibröz kitosan doku iskelesinden nanopartiküller aracılığıyla ardışık salınan BMP-2 ve BMP-7'nin farklılaşmayı indüklediğini bildirmişlerdir.

Günümüzde doku mühendisliği prensiplerine bağlı kalınarak periodontal rejenerasyonda doku iskelesi kullanımı ile büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrollü ve çoklu salımı üzerinde durulmaktadır (96). Taşıyıcı kullanımı ile kontrollü salım sağlanarak; büyüme ve farklılaşma faktörlerinin yarı ömürlerinin kısa olması, özgül bir bölgeye ulaştırılma gereksinimi ve ortamda çözünür olmaları gibi problemlerin önüne geçilmiştir. Büyüme ve farklılaşma faktörlerinin çoklu salımı ile hücre büyüme ve farklılaşmasının farklı evrelerine etki gösteren faktörlerin bir arada kullanımı sağlanarak hücre fonksiyonları üzerindeki etkinin artırılması ve kontrolü hedeflenmektedir.

Lynch ve diğ. (97) rhPDGF ve rh-IGF-I kombinasyonlarının eş zamanlı, kontrollü salımının periodontal rejenerasyondaki etkilerini incelemişlerdir. Köpeklerde yapılan bu çalışmada periodontal defektlere metilselüloz jel ile uygulanan rhPDGF ve rh-IGF-I kombinasyonunun (3/3 µg) 2-5 haftalık iyileşme dönemlerinde kontrol grubuna kıyasla sement ve kemik oluşumunu anlamlı olarak artırdığını göstermişlerdir.

Howell ve diğ. (98) çift taraflı kemik içi veya furka defekti olan 38 hastada yapmış olduğu bir çalışmada, rhPDGF ve rhIGF-I'in düşük doz (50 µg/ml) ve yüksek doz (150 µg/ml) kombine uygulamaları ayrı ayrı test edilmiştir. Çalışmanın sonuçları yüksek doz rhPDGF ve rhIGF-I uygulamasının periodontal defektlerde daha fazla kemik dolumu sağladığını göstermiştir.

Chen ve diğ. (96)'nin yapmış olduğu *in vitro* çalışmada hidrojel taşıyıcı içerisine yerleştirilmiş mikroküreler içerisindeki BMP-2 ve IGF-I'in kombine kullanımının PDL fibroblastlarının ataçmanına, metabolizmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına olan etkisinin BMP-2 ve IGF-I'in ayrı ayrı



salımının sağlandığı gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Doku mühendisliği uygulamaları kapsamında son zamanlarda büyüme ve farklılaşma faktörlerinin çoklu ve ardışık salımı üzerinde durulmaktadır. Doku iyileşmesinin doğal sürecine benzer olarak hazırlayıcı (competence) ve ilerletici (progression) büyüme ve farklılaşma faktörlerinin bir arada kullanılması, buna ek olarak kullanılacak bu biyomoleküllerin birbiriyle sinerjistik etkisinin bulunması ve bu faktörlerin hedeflenen doku için uygun karakterde bir doku iskelesinden kontrollü ve beklenen şekilde ardışık olarak salımının sağlanması doku mühendisliği kapsamında yapılan rejeneratif çalışmaların geliştirilmesi için önem arz etmektedir.

### 3. GEREÇLER VE YÖNTEM

Kompozit doku iskelesinin oluşturulması	<i>İn-vitro</i> salım çalışmaları	Hücre kültürü deneyleri
<p>1) Aljinat mikrokürelerin hazırlanması ve IGF-I ile yüklenmesi</p> <p>2) Karakterizasyon çalışmaları</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Boy ve boy dağılımlarının belirlenmesi</li> <li>• Şişme deneyleri</li> <li>• Biyobozunurluk çalışmaları</li> <li>• FTIR analizi</li> </ul> <p>3) PLGA nanopartiküllerin hazırlanması ve BMP-6 ile yüklenmesi</p> <p>4) Karakterizasyon çalışmaları</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Partikül büyüklüğünün ölçümü</li> <li>• SEM analizi</li> <li>• FTIR analizi</li> </ul> <p>5) Kitosan doku iskelesine aljinat mikrokürelerin ve PLGA nanopartiküllerin entegre edilmesi ile kompozit yapının üretimi</p>	<p>1) Aljinat mikrokürelerden BSA salımının incelenmesi</p> <p>2) PLGA nanopartiküllerden BSA salımının incelenmesi</p>	<p>1) Hücre proliferasyonu (<i>MTT analizi</i>)</p> <p>2) Gen İfade Seviyeleri (<i>RT-PCR</i>)</p> <p>3) Mineralizasyon tayini (<i>von Kossa boyaması</i>)</p> <p>4) Hücre morfolojisi (<i>SEM analizi</i>)</p>

Tablo 3.1 Gereç ve Yöntem/ çalışma planı.

#### 3.1 Aljinat mikrokürelerin hazırlanması ve IGF-I ile yüklenmesi

Çalışma kapsamında aljinat mikrokürelere erken dönem farklılaşma faktörü olan IGF-I'in yüklenmesi işlemi gerçekleştirildi. Aljinat (Fluka, Almanya) mikroküreler elektrospreyleme yöntemi kullanılarak hazırlandı (99). Değişik elektriksel potansiyel farklarda küre formunda yapılar oluşmasını

sağlayan elektrospreyleme, elektro hidrodinamik atomizasyon olarak da adlandırılmaktadır. Basit bir elektrospreyleme düzeneği; şırınga pompası, voltaj kaynağı ve toplayıcıdan oluşmaktadır. Sistem, iğne ucu ile toplayıcı arasında potansiyel fark oluşturulması temeline dayanmaktadır. Elektrospreyleme tekniğinde şırınga pompası yardımıyla istenilen hızda akıtılan polimer çözeltisi, iğne ucuna uygulanan voltajın etkisiyle küçük küreler halinde damlar. Oluşan bu küreler, toplayıcı olarak genellikle multivalent katyonların çözeltisine damlatılarak çapraz bağlanmaları sağlanır. Üretilen mikrokürelerin boyut dağılımı dikkate alındığında, dağılım aralığının dar ve standart sapmasının çok düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca, püskürtülen polimerin küre oluşma esnasında, çapraz bağlayıcı çözelti içerisinde kendiliğinden dağılması sonucu kümelenmemesi veya çökmemesi, sistemin diğer avantajlarını oluşturmaktadır. Üretim sürecinde, diğer mikroküre üretim yöntemlerinden farklı olarak, toksik kimyasalların kullanımına yer yoktur. Elektrospreyleme yönteminde mikroküre boyutunu etkileyen temel parametreler, uygulanan voltaj, polimerin akış hızı ve şırınga-toplayıcı arasındaki mesafe olarak sıralanabilir (100). Öncelikle distile su içerisinde % 2'lik aljinat çözeltisi hazırlandı ve manyetik karıştırıcıda 1 gece boyunca karışma sağlandı. Daha sonra çözelti süzüldü ve 22 G uçlu şırıngaya alındı. Üretim parametrelerini belirlemek amacıyla farklı voltajlar (güç kaynağı; Gamma High-Voltage Research, FL, ABD) ve akış hızları (şırınga pompası; New Era Pump Inc., ABD) uygulanarak öncül çalışmalar yapıldı. Belirlenen parametreler doğrultusunda, aljinat çözeltisi kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) çözeltisi içerisine spreylendi ve çapraz bağlamanın gerçekleşmesi için bu ortamda 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda  $\text{CaCl}_2$  ortamdan uzaklaştırıldı, küreler distile su ile 1 kez yıkandı ve 1 saat % 70'lik etanolde bekletildi. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla  $-20^\circ\text{C}$  ve  $-80^\circ\text{C}$ 'de 1'er gece kurutma işlemi gerçekleştirildi. Aljinat mikrokürelere IGF-I (R&D, ABD) yüklemek için, belirlenen konsantrasyondaki IGF-I (250 ng/mg partikül) aljinat çözeltisi içerisine eklendi ve homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırma yapıldıktan sonra elektro spreyleme işlemi gerçekleştirildi.

## **3.2 Aljinat Mikrokürelerin Karakterizasyon Çalışmaları**

### **3.2.1 Boy ve Boy Dağılımlarının Belirlenmesi**

Aljinat mikrokürelerin boy ve boy dağılımını belirlemek amacıyla ışık mikroskobu altında fotoğrafları çekildi. Daha sonra Image J programı (Ulusal Sağlık Enstitüsü-National Institute of Health, MD, ABD) kullanılarak 100 adet mikrokürenin çapları ölçüldü. Elde edilen veriler doğrultusunda mikrokürelerin ortalama çapları ve çap dağılımları hesaplandı.

### **3.2.2 Şişme DeneYleri**

Kuru haldeki mikroküreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH:7.4) içerisine alındı ve belirlenen zaman aralıklarında ışık mikroskobu altında fotoğrafları çekildi. Mikrokürelerin zamana bağlı hacimsel değişimleri göz önünde tutularak şişme oranları hesaplandı ve grafik üzerinde gösterildi.

### **3.2.3 Biyobozunurluk Çalışmaları**

PBS içerisine alınan mikroküreler 37°C'deki etüv içerisine koyuldu. Belli zaman aralıklarında, ışık mikroskobu kullanılarak morfolojik gözlem yapıldı ve yapısal bütünlüğün takibi gerçekleştirildi.

### **3.2.4. Fouier Transform Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) Analizi**

Aljinat mikrokürelerin kimyasal analizini gerçekleştirmek amacıyla 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) spektrumları alındı. *In vitro* salım çalışmaları kapsamında, mikrokürelere sığır serum albumin (BSA) yüklendikten sonra da FTIR analizi tekrarlandı ve karşılaştırma yapıldı.

### 3.3 PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve BMP-6 ile yüklenmesi

PLGA (nanopartiküller emülsiyon-difüzyon-evaporasyon yöntemi ile hazırlandı (101). PLGA kopolimeri (50:50 bileşimine sahip) etil asetat içerisinde çözülerek % 2'lik (w/v) organik faz oluşturuldu. Elde edilen organik faz, içerisinde %1 (w/v) oranında çözünmüş didodesildimetilamonyumbromür (DMAB) bulunan sulu faza ilave edildi ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15000 rpm'de karıştırıldı. Karışıma sıcak su eklenerek içerisinde bulunan organik fazın uçması beklendi ve sulu fazda süspansiyon halinde PLGA nanopartiküller elde edildi. BMP-6 (Uscn, Çin)'nin partiküllere yüklenmesi için, belirlenen konsantrasyondaki BMP-6 (250 ng/mg partikül) organik faza eklendi ve üretim bu şekilde gerçekleştirildi.

### 3.4 PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

#### 3.4.1 Partikül büyüklüğü ölçümü

Üretildikten sonra sulu faz içerisinde muhafaza edilen PLGA nanopartiküllerin boy dağılımlarının ölçülebilmesi için, nanopartiküllerin bulunduğu çözelti 1:10 oranında seyreltildi ve Zetasizer Nano-S (Malvern Ins., İngiltere) ile partiküllerin boy dağılımları belirlendi.

#### 3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Sulu fazda bulunan PLGA nanopartiküller, analiz yapılacak yüzeye damlatılıp, kurutulduktan sonra altın-paladyum alaşımı ile kaplandı ve taramalı elektron mikroskobu (Zeiss, Evo 50, Almanya) ile incelendi.

#### 3.4.3. FTIR analizi

PLGA nanopartiküllerin kimyasal yapılarının belirlenebilmesi için 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) spektrumları alındı. *In vitro* salım çalışmaları kapsamında, nanopartiküllere BSA yüklendikten sonra da FTIR analizi tekrarlandı ve spektrumlar karşılaştırıldı.

### 3.5 *In vitro* Salım Çalışmaları

#### 3.5.1 Aljinat mikrokürelere BSA salımının incelenmesi

Model salım çalışmaları kapsamında aljinat mikrokürelere BSA yüklendi. Bu amaçla aljinat çözeltisi hazırlanırken, aljinat miktarının ağırlıkça (w/w) % 5'i oranında BSA çözelti içerisine katıldı ve spreyleme işlemi bu şekilde gerçekleştirildi. Enkapsülasyon verimini belirlemek amacıyla 15 mg aljinat mikroküre 10mM etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) içeren 1 mL PBS içerisinde 1 gece bekletildi. *In vitro* salım profilini elde etmek amacıyla ise, 20 mg partikül 5 mL PBS içerisine koyuldu ve 37°C'de salım çalışmaları gerçekleştirildi. Aljinat mikrokürelere salınan BSA miktarı ve enkapsülasyon verimi NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, ABD) ile tayin edildi.

#### 3.5.2 PLGA nanopartiküllerden BSA salımının incelenmesi

Model salım çalışmaları kapsamında PLGA nanopartiküllere BSA yüklendi. Bu amaçla nanopartikül üretim aşamasında sulu faza polimerin % 5'i oranında BSA eklendi. Salım çalışmaları için 25 mg PLGA 1 mL PBS içerisine alındı ve 37°C'de *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirildi. Enkapsülasyon verimini belirlemek amacıyla 25 mg PLGA nanopartikül 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde 1 gece bekletildi. PLGA nanopartiküllerden salınan BSA miktarı ve enkapsülasyon verimi NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, ABD) ile tayin edildi.

### 3.6 Kitosan Doku İskelesi/Aljinat Mikroküre/PLGA Nanopartikül İçeren Kompozit Yapının Oluşturulması

Büyüme faktörlerini sıralı salınan bir sistem oluşturmak amacıyla mikrokürelere ve nanopartikülleri taşıyan kitosan (Sigma-Aldrich, Almanya) doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlandı. Öncelikle 0.2 M asetik asit içeren distile su içerisinde % 1.1'lik kitosan çözeltisi hazırlandı (102). Hazırlanan çözelti 48 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu süre sonunda belirlenen miktardaki nanopartiküller (iskele başına 2 mg

nanopartikül koyuldu) 500 µL distile su ile kitosan çözeltisine eklendi. Eklenen su miktarına bağlı olarak hesaplanan miktarda kitosan ve asetik asit de çözeltiye eklendikten sonra karıştırma işlemi 2 saat daha devam ettirildi. Daha sonra kalıplara dökülen çözelti -20°C'de donduruldu ve liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutma işlemi gerçekleştirildi. Sırasıyla % 96'lık ve % 70'lik etanol ile muamele edilerek stabilizasyonları gerçekleştirilen doku iskelelerine tekrar kurutma işlemi uygulandı. Elde edilen doku iskelelerine aljinat mikrokürelerin yüklenmesi emdirme yöntemi ile gerçekleştirildi. Aljinat mikroküreler ultraviyole (UV) ile steril edildi ve steril PBS içerisine alınarak, yine steril koşullarda 100 µL PBS ile doku iskelelerine yüklendi. Bir mg aljinat mikroküre 100 µL PBS içerisinde doku iskelelerine emdirildi ve son kez liyofilizatörde kurutma işlemi gerçekleştirildi.

### **3.7 Hücre Kültürü Çalışmaları**

#### **3.7.1 Sementoblastların elde edilmesi**

Çalışmada NIDCR (National Institute of Dental and Craniofacial Research) başkanı Prof. Dr. Martha J. Somerman tarafından sağlanan immortalize sementoblast hücre serisi (OC-CM) kullanıldı. Sementoblast hücre serisinin elde edilmesi için; osteokalsin promoterdriven SV-40 T antijeni transjenik fareler (OC-TAg) kullanılmıştır. Bu amaçla, 41 günlük farelerin alt çeneleri rezeke edilerek molar dişleri çıkartılmıştır. Diseksiyon mikroskobu altında çalışılarak alveol kemiğinden gelebilecek osteoblastların doku örneklerine alınması engellenmiştir. SV-40 TAg ekspresyonunun artmasının sağlanması ile PDL hücrelerinin değil, osteokalsin ekspresyonunun yüksek olduğu sementoblast hücrelerinin immortalize edilmesi sağlanmıştır (68).

### 3.7.2 Hücre Kültürü deney grupları

Hücre kültürü çalışmalarında aşağıdaki deney grupları oluşturuldu;

- 1) Kitosan doku iskelesi grubu (Kitosan)
- 2) IGF-I yüklü mikroküreleri içeren kitosan doku iskelesi grubu (Kitosan/Aljinat)
- 3) BMP-6 yüklü nanopartikülleri içeren kitosan doku iskelesi grubu (Kitosan/PLGA)
- 4) Mikroküreleri ve nanopartikülleri içeren kitosan doku iskelesi grubu (Kompozit yapı)

### 3.7.3 Hücre Ekimi

Doku iskeleleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında parafilm ile kaplanmış 24-gözlü kültür kapları kullanıldı. Parafilmler, 24 gözlü kapların tabanını kaplayacak şekilde kesildi ve kullanılıncaya kadar % 70 etanol içerisinde bekletildi. Hücre kültürü çalışmasından önce parafilmler, kapların içerisine yerleştirilerek 30 dakika % 70 etanol ve 45 dakika UV ile sterilize edildi. On mm çapında ve 2 mm kalınlığında doku iskeleleri 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi ve iskelelerin sterilizasyon işlemleri 30 dakika % 70 etanol ve 45 dakika UV ile muamele edilerek gerçekleştirildi. Ekimden önce iskeleler iki kez PBS, bir kez de serum içermeyen hücre kültür ortamı ile yıkanarak etanolün uzaklaşması sağlandı. Sementoblast hücreleri aktif olarak üredikleri doku kültürü kaplarından tripsin yardımıyla kaldırıldı ve hücreler 50 µL büyüme ortamı ile iskelelere ekildi ( $5 \times 10^4$  hücre/iskele konsantrasyonu). Hücre yapışmasını beklemek amacıyla yaklaşık 3 saat beklendi ve her bir göze 1 mL büyüme ortamı [% 89 *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM), % 10 fötal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin-streptomisin] eklendi. Yirmidört saat sonra büyüme ortamı, 10 mM β-gliserol fosfat, 50 µg/mL askorbik asit içeren mineralizasyon ortamı ile değiştirildi. Çalışmalar boyunca hücreler 37°C'lik inkubatörde (% 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nemlilik; Hereaus, Almanya) inkübe edildi.



### 3.7.4 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Analizi

Doku iskeleleri üzerinde üreyen sementoblast hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri, kültür süresince farklı zamanlarda (2, 4, 6, 8 ve 12. günlerde), MTT ile kantitatif olarak tayin edildi. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. MTT yönteminde oluşan bu kristaller izopropanol içerisinde çözülürken, ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değerleri okunarak ve elde edilen bu absorbans değerinin, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı hakkında bilgi verdiği kabul edilir.

MTT analizi için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldı. Ardından, her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklendi. Hücreler bu şekilde 37°C'deki etüvde 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sürecinden sonra, doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırıldı ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarıldı. Her bir göze 400 µL izopropanol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Optik yoğunluk, elde edilen çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropate okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### 3.7.5 Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku iskelelerine  $5 \times 10^4$  hücre ekildi ve 1 mL büyüme ortamı (% 89 DMEM, % 10 FBS ve % 1 penisilin-streptomisin) eklendi. Yirmidört saat sonra büyüme ortamı, 10 mM β-gliserol fosfat, 50 µg/mL askorbik asit içeren farklılaşma ortamı ile değiştirildi. Çalışmalar boyunca hücreler 37°C'lik inkubatörde (% 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nemlilik; Heraeus, Almanya) inkübe edildi. Dördüncü ve 12. günlerde trizolQIAzolLysisReagent (Qiagen, ABD) kullanılarak hücre lizatı elde edildi. Elde edilen hücre lizatından RNAeasy kiti (Qiagen ABD) kullanılarak RNA örnekleri hazırlandı. Ancak, çalışma kapsamında elde edilen RNA kalitesinin PCR çalışmaları için yeterli düzeyde olmadığı saptandığından gen ifade seviyesi tayini deneylerinin devamlılığı açısından elde edilen RNA örneklerinin saflaştırılma işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla RNA cleanup kiti (Qiagen, ABD) üretici firmanın önerileri

doğrultusunda kullanıldı. 30 µl olan örnekler 70 µl distile su kullanılarak 100 µl'ye tamamlandı. Her örnek üzerine 250 µl etanol eklendi. Örnekler kite ait özel kolonlara yerleştirilerek 30 saniye santrifüj işlemine tabi tutuldu. Filtreden geçerek kolonların alt kısmında biriken sıvı örnek dökülerek üst kısmına kite ait RPE çözeltisi eklendi (500 µl). Yapılan 2 dakikalık santrifüj işleminden sonra yine kolonların alt kısımlarında biriken sıvı örnekler uzaklaştırıldı. Kolonlardan çıkarılan filtreli iç kısımlar ependorf tüplere yerleştirildi. Üzerlerine 30 µl distile su ilave edilerek 1 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı ve ependorf tüplerde saf RNA elde edildi. Saflaştırılan RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık ölçümleri NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak tayin edildi. İzole edilen RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 50°C'de 30 dakikada gerçekleştirildi. Ardından, PCR'ın ilk aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dakikada, 40 döngüde denatürasyon ile çoğalma basamağı 94°C'de 15 saniyede, primerlerin ortamda bulunan hedef DNA bileşeni ile birleşip, ayrılma basamağı 55°C'de 30 saniyede ve uzatma basamağı ise 72°C'de 30 saniyede gerçekleştirildi. β-aktin geni referans gen olarak kullanılarak OCN, tip-I kollajen ve  *runt-related transcription factor 2* (Runx2)'nin gen ifade seviye düzeyleri tayin edildi. Her bir gen için kullanılan primerler (Motek, Türkiye) Tablo 3.7.1'de özetlenmiştir.

### 3.7.6 von Kossa Boyaması

Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla, hücre kültür çalışmasının 8. ve 12. Günlerinde oluşan mineralize nodüllerin gösterilmesi için von Kossa boyama uygulandı. Öncelikle hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak PBS ile iki kez yıkama işlemi uygulandı. Daha sonra, buzla soğutulmuş % 100 etanol ile oda sıcaklığında 20 dakika fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fiksasyon işleminden sonra hücreler 30 dakika % 5'lik AgNO<sub>3</sub> (0.5 g AgNO<sub>3</sub>/mL su) ile karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra deiyonize su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve örnekler 2 dakika UV ışığına maruz bırakıldı.

<b>RT-PCR analizinde kullanılan genlere ait Primerler</b>		
<b>Genler</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
<b><i>β-aktin</i></b>	5'-GTG CTA TGT TGC CCT AGA CTT CG-3'	5'-GAT GCC ACA GGA TTC CAT ACCC-3'
<b><i>Tip-I kollajen</i></b>	5'-CAA GAT GTG CCA CTC TGA CT-3'	5'-TCT GAC CTG TCT CCA TGT TG-3'
<b><i>Runx2:</i></b>	5'-GCA TGG CCA AGA AGA CAT CC-3'	5'-CCT CGG GTT TCC ACG TCTC-3'
<b><i>Osteokalsin</i></b>	5'-CTT TCT GCT CAC TCT GCTG-3'	5'-TAT TGC CCT CCT GCT TGG-3'

Tablo 3.7.1 RT-PCR analizinde her bir gen için kullanılan primerlerin listesi.

### 3.7.7 SEM Analizi

Hücrelerin doku iskelesi üzerindeki görüntülerinin belirlenmesi amacıyla SEM analizleri gerçekleştirildi. Hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki morfolojilerinin, yapışma ve yayılma eğilimlerinin görüntülenmesi için 2., 4. ve 8. günlerde SEM analizleri yapıldı (Zeiss Evo 50, Almanya). SEM analizi için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldı ve doku iskeleleri birer kez PBS (pH=7.4) ile yıkandı. Daha sonra % 2.5'lük glüretaldehit çözeltisi (PBS içerisinde) ile 30 dk boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fiksasyon işleminden sonra tekrar PBS ile yıkanan örnekler, ikişer dakika etanol serilerinde (% 30, % 50, % 70, % 90 ve % 100 (v/v)) bekletildi ve hücrelerin içerisindeki suyun yapıdan uzaklaştırılması sağlandı. Örnekler son olarak hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dakika bekletildi ve havada kurutma işlemi gerçekleştirildi. Örneklerin SEM görüntüleri, yüzeyleri altın-paladyum tabakası ile kaplanarak alındı. Farklı büyütme oranlarında görüntüler elde edilerek doku iskeleleri ve hücrelerin morfolojik özellikleri incelendi.

### 3.8 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları GraphPad InStat® programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Veriler üç deney için ortalama±standart sapma değerleri ile birlikte sunuldu. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

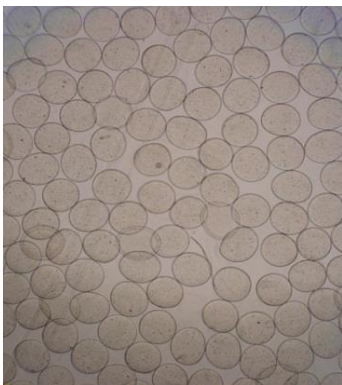
### 4.1 Aljinat Mikrokürelerin Hazırlanması

Çalışmada erken dönem farklılaşmada görev alan bir büyüme faktörü olan IGF-I'in salımı için biyobozunurluğu kısa sürede gerçekleşen bir malzeme olan aljinat seçildi. IGF-I'in salımında kullanılacak aljinatın elektrospreyleme yöntemi ile mikroküre formunda üretilmesine karar verildi. Araştırmada optimum koşulları belirlemek amacıyla çeşitli öncül çalışmalar yapıldı. Uygulanan voltaj 10-20 kV arasında ve akış hızı 10, 20, 40 ve 80 mL/sa olarak değiştirildi. Ayrıca şırınga ucu-toplayıcı arasındaki mesafe, 5 ve 10 cm olmak üzere farklı denemeler yapıldı. Elde edilen veriler ışığında optimum koşullar; voltaj 20 kV, akış hızı 10 mL/sa ve şırınga-toplayıcı arasındaki mesafe 10 cm olarak belirlendi.

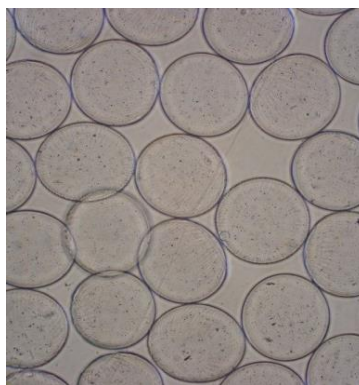
### 4.2 Aljinat Mikrokürelerin Karakterizasyon Çalışmaları

#### 4.2.1 Boy ve boy dağılımlarının belirlenmesi

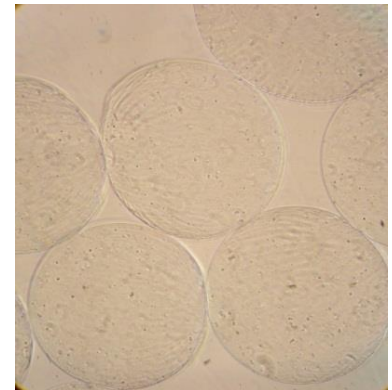
Aljinat mikrokürelerin morfolojik incelemeleri ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi. Şekil 4.2.1'de aljinat mikrokürelerin optik mikroskop görüntülerine yer verimıştır. Küresel bir görüntü sergileyen mikrokürelerin ortalama çapları  $296 \pm 18$   $\mu\text{m}$  olarak hesaplandı. Standart sapma değerleri mikrokürelerin eş boy dağılımına sahip olduğunu göstermektedir.



x4



x10

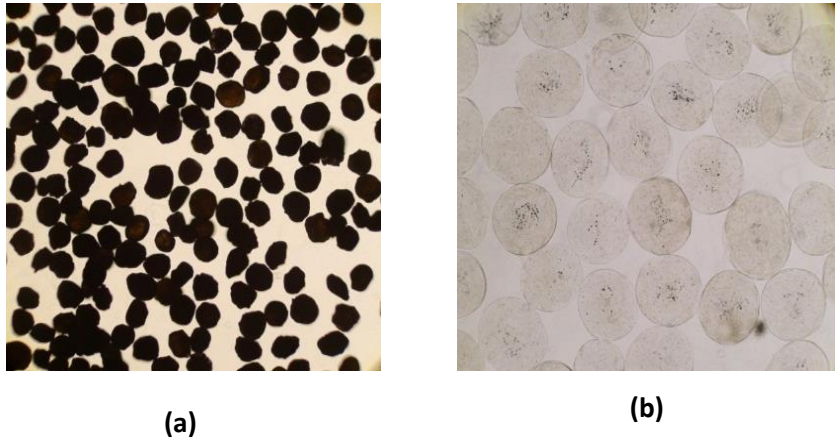


x20

Şekil 4.2.1 Aljinat mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri.

#### 4.2.2. Şişme Deneyleri

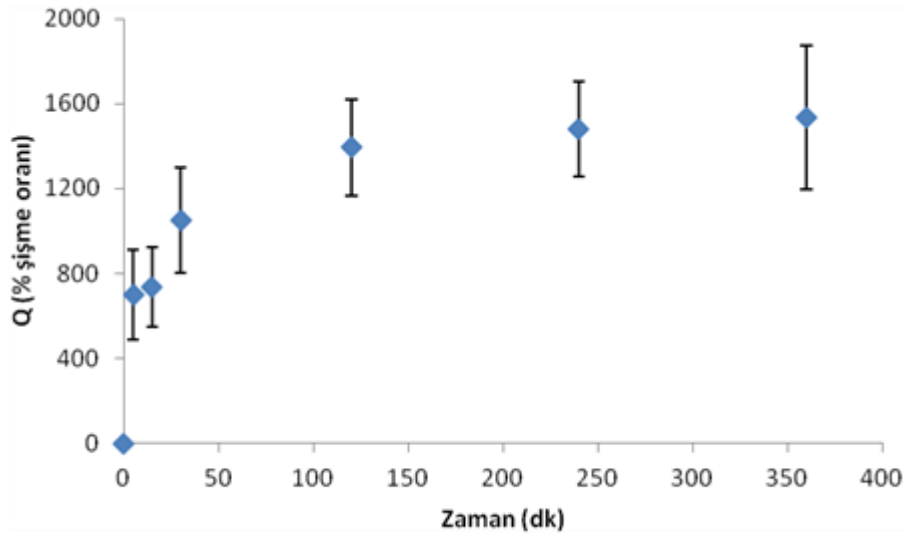
Aljinat mikroküreler üretim aşamasından sonra liyofilizasyon tekniği ile kurutuldu. Daha sonra kuru küreler şişme çalışmalarının yürütülmesi için PBS (pH:7.4) içerisine alındı. Mikrokürelerin kuru ve şişmiş halleri Şekil 4.2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.2 Aljinat mikrokürelerin kuru (a) ve şişmiş (b) halleri (x4).

Eşitlik 1 kullanılarak aljinat mikrokürelerin şişme oranları belirlendi ve zamana karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2.3). Kürelerin ilk 5 dakikada hızlı bir şekilde şişmiş oldukları ve yaklaşık 2. saat sonunda denge şişmesine ulaştıkları kaydedildi. Ayrıca kuruyan kürelerin şişme özelliklerinin geri dönüşümlü olduğu belirlendi.

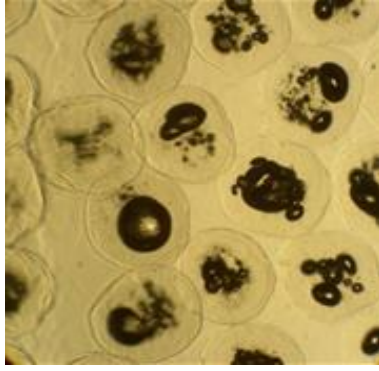
$$\text{Şişme Oranı (Q)} = \frac{\text{Kuru hacim}}{\text{Şişmiş hacim}} \times 100 \quad (1)$$



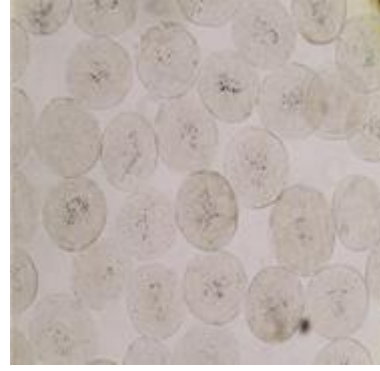
Şekil 4.2.3 Aljinat mikrokürelerin şişme kinetiği.

#### 4.2.3 Biyobozunurluk Çalışmaları

Biyobozunurluk çalışmaları kapsamında PBS tamponu (pH:7.4) içerisinde 37°C'de bekletilen aljinat mikrokürelerin belli zaman aralıklarında optik fotoğrafları çekildi. Kuru halde PBS tamponuna koyulan kürelerin öncelikle şişerek dengeye geldikleri gözlemlendi. Şişen kürelerin 48 saat boyunca küresel formlarını koruduğu gözlemlendi. Ancak, iyonik bağlarla zayıf olarak çapraz bağlanmış mikrokürelerin 72. saat sonunda yapısal bütünlüklerini kaybetmeye başladıkları kaydedildi (Şekil 4.2.4).



**İlk halleri (x10)**



**48 saat sonra (x4)**



**24 saat sonra (x10)**



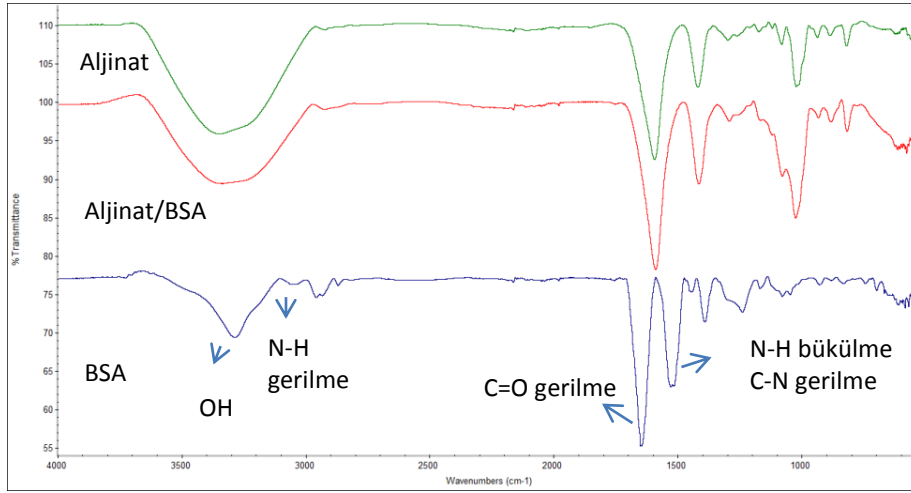
**72 saat sonra (x4)**

Şekil 4.2.4 Aljinat mikrokürelerin biyobozunurluk çalışması kapsamında çekilen optik fotoğrafları.

#### 4.2.4 FTIR Analizi

Şekil 4.2.5'de aljinat mikrokürelere ait FTIR spektrumları bulunmaktadır. Yapıya ait karakteristik pikler şekil üzerinde gösterilmiştir. Aljinat ve BSA'nın kimyasal yapısı birbirine benzediğinden, BSA yüklenmesinin yapının kimyasal özelliklerini çok fazla değiştirmedeği gözlemlendi. Ancak, BSA'nın varlığıyla birlikte N-H gerilme pikinin belirginleştiği, C=O gerilme ve N-H bükülme, C-N gerilme piklerinin genişlediği izlendi (103).





Şekil 4.2.5 Aljinat mikrokürelerin BSA yüklenmeden önceki ve sonraki FTIR spektrumları.

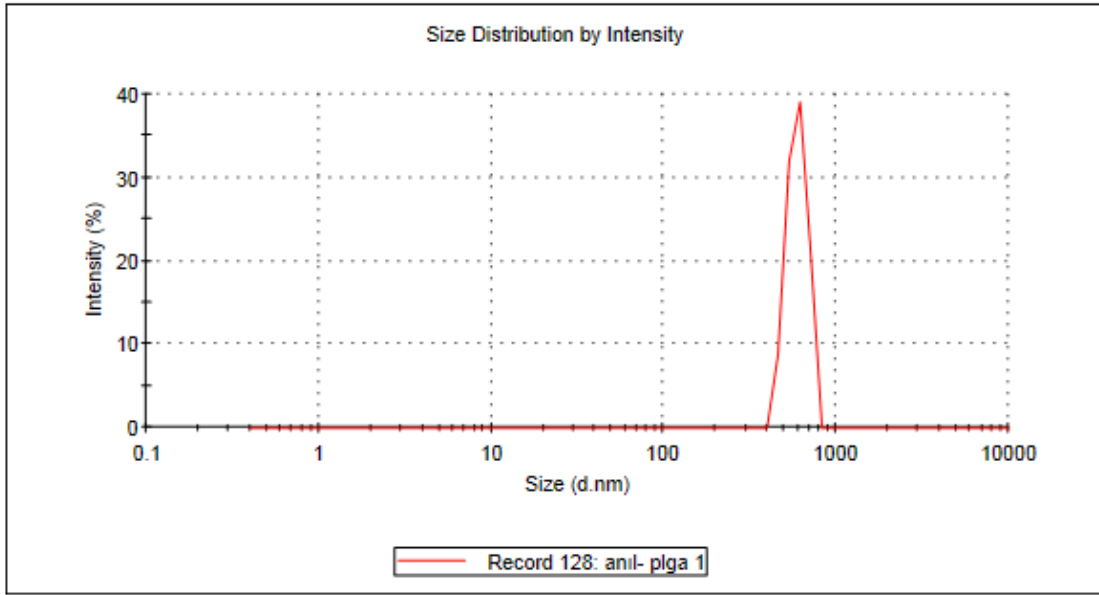
### 4.3 PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA nanopartiküllerin üretiminde emülsiyon-difüzyon-evaporasyon yöntemi kullanıldı. Yöntemde, polimer bir organik çözücü içerisinde çözüldükten/dağıtıldıktan sonra elde edilen çözelti stabilizör içeren sulu çözelti ile karıştırıldı. Bu karıştırma sonucunda, stabilizör ile çevrelenmiş, çözülmüş polimeri taşıyan organik faz damlacıkları oluştu. Organik faz yapıdan buharlaşarak uzaklaştıktan sonra suda dağılmış polimerik partiküller elde edildi. Organik faz ve sulu faz karıştırıldıktan sonra yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak partikül boyutu kontrol edildi.

## 4.4 PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışması

### 4.4.1 Partikül Büyüklüğü Ölçümü

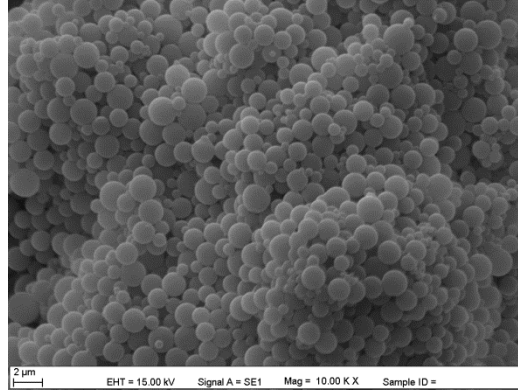
PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı analizi Zetasizer (Malvern Ins., İngiltere) ile gerçekleştirildi. Üretilen nanopartiküllerin boyutları 1232 nm ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) 0.6 olarak bulundu (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1 PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları.

### 4.4.2 SEM Analizi

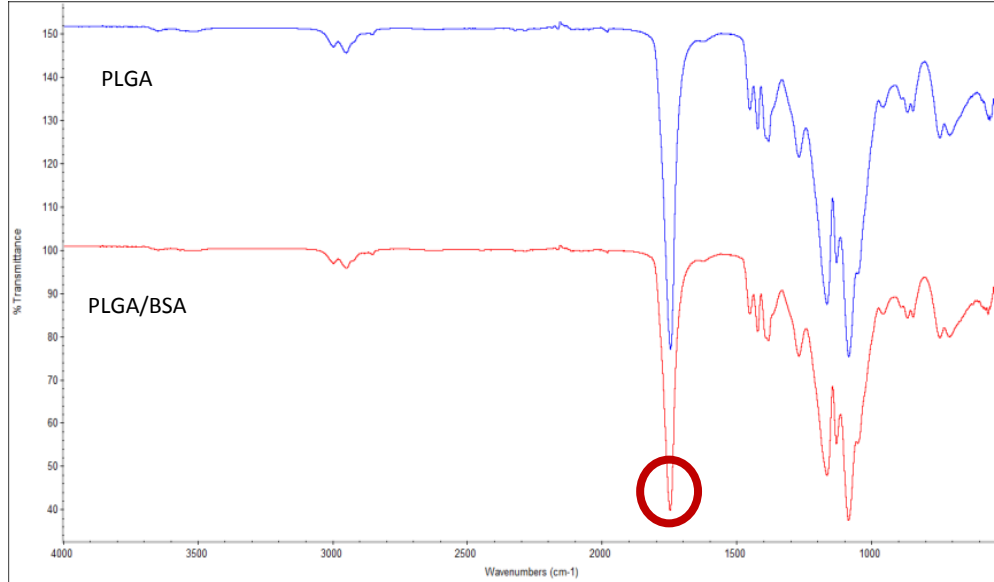
SEM analizi sonucunda PLGA nanopartiküllerin tek tek ve küresel formda oldukları görüldü ve boyutları  $1311 \pm 319$  nm olarak hesaplandı (Şekil 4.4.2). Elde edilen veriler Zetasizer (Malvern Ins., İngiltere) ölçümleri ile uyumlu bulundu.



Şekil 4.4.2 PLGA nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

#### 4.4.3 FTIR Analizi

FTIR analizi sonucunda Şekil 4.4.3' de verilen spektrumlar elde edildi. PLGA'nın yapısındaki karakteristik, aldehit ve keton gruplarına ait, C=O gerilme titreşimleri  $1756.23 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi. Yüklenen BSA miktarı az olduğundan varlığı FTIR' da belirlenemedi (104).

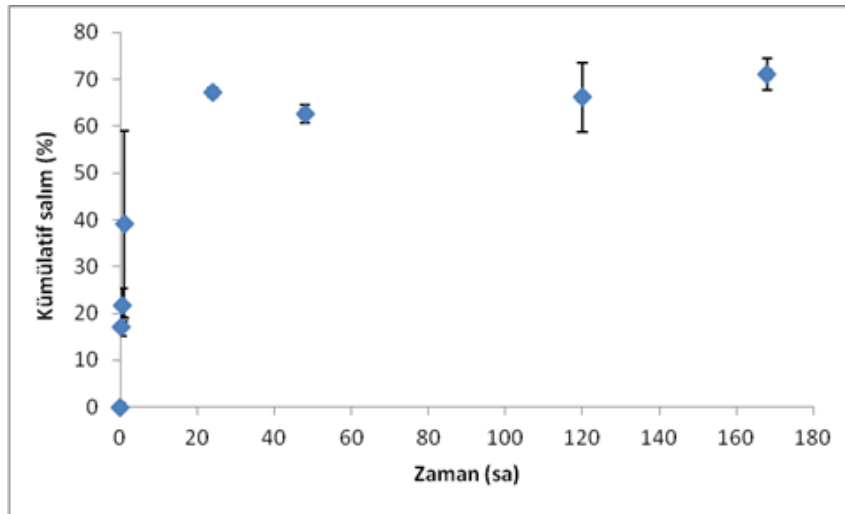


Şekil 4.4.3 PLGA nanopartiküllerin BSA yüklenmeden önceki ve sonraki FTIR spektrumları.

## 4.5 *In vitro* Salım Çalışmaları

### 4.5.1 Aljinat Mikrokürelerden BSA Salımının İncelenmesi

BSA yüklenmiş aljinat mikrokürelerin öncelikle enkapsülasyon verimleri hesaplandı. Bu amaçla aljinat mikroküreler EDTA çözeltisi içerisinde alındı (EDTA bir şelasyon ajanı olduğu için yapıdaki Ca iyonlarını bağlayarak aljinat mikrokürelerin yapısal bütünlüğünün bozulmasına ve enkapsüle ettikleri BSA'nın ortama salınmasına neden olmaktadır). NanoDrop ile yapılan ölçümler sonrasında enkapsülasyon verimi % 40 olarak belirlendi. Aljinat mikroküreler üretim aşamasından sonra, çapraz bağlanmanın tam olarak gerçekleşebilmesi için 24 saat  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içerisinde bekletildi. Bu nedenle yüklenen proteinin bir miktarının bu esnada ortama salındığı kabul edilebilir. Salım kinetiği incelendiğinde enkapsüle edilen BSA'nın yaklaşık % 60'nın ilk 24 saat içerisinde salındığı ve salımın toplamda 160 saat sürdüğü belirlendi.

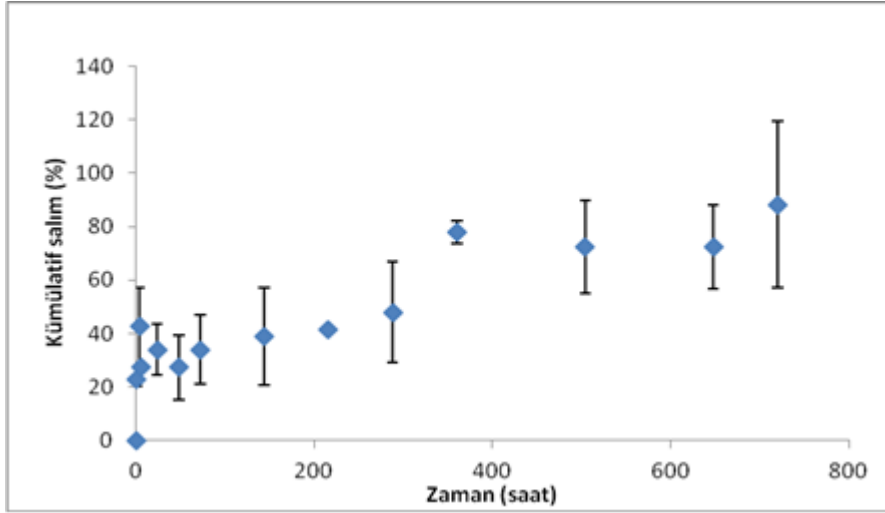


Şekil 4.5.1 Aljinat mikrokürelerden BSA'nın salım kinetiği.

### 4.5.2 PLGA Nanopartiküllerden BSA Salımının İncelenmesi

PLGA nanopartiküllere yüklenen BSA'nın öncelikle enkapsülasyon verimini belirlemek için partiküllerin DMSO içerisinde 24 saat bekletilerek çözümleri sağlandı. NanoDrop ile yapılan ölçümler sonrasında enkapsülasyon verimi %10 olarak belirlendi. Salım kinetiği incelendiğinde enkapsüle edilen BSA'nın yaklaşık 30 gün boyunca kontrollü olarak salındığı

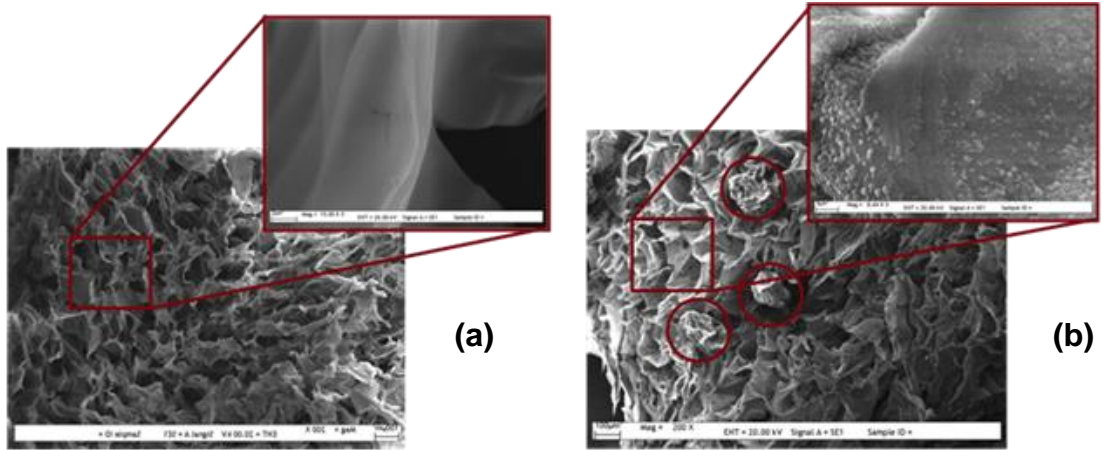
ve salınan miktarın da, yüklenen BSA' nın yaklaşık % 80'i olduğu belirlendi (Şekil 4.5.2).



Şekil 4.5.2 PLGA nanopartiküllerden BSA'nın salım kinetiği.

#### 4.6 Kitosan Doku İskelesi/Aljinat Mikroküre/PLGA Nanaopartikül İçeren Kompozit Yapının Oluşturulması

Kitosan doku iskelelerini kullanarak oluşturulan kompozit yapıda, PLGA nanopartiküller yapıya iskelelerin hazırlık aşamasında katıldı, aljinat mikroküreler ise doku iskeleleri kurutulduktan sonra yapıya emdirildi. Oluşturulan kompozit yapının SEM görüntüleri Şekil 4.6.1'de verilmiştir. Kitosan doku iskelelerinin içsel bağlantılara sahip gözenekli bir yapıda olduğu belirlendi. Ayrıca nanopartiküller ve mikroküreler, yapıya katıldıktan sonra, yapı içerisinde homojen olarak dağıldığı ve gözenek yapısına herhangi bir şekilde zarar vermediği gözlemlendi. Kitosan doku iskeleleri ile yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda gözenek çaplarının 30-150  $\mu\text{m}$  arasında değiştiği ve yaklaşık % 80 gözenekliliğe sahip oldukları belirlendi. Liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan iskeleler tekrar PBS içerisine alındığında 3 dakika gibi kısa bir sürede denge şişmeye geldikleri gözlemlendi ve şişme oranı %  $36.7 \pm 0.2$  olarak bulundu. Mekanik testler sonucunda biyomalzemelerin elastik modülleri  $0.0917 \pm 0.0001 \text{ N/m}^2$  olarak hesaplandı (105).

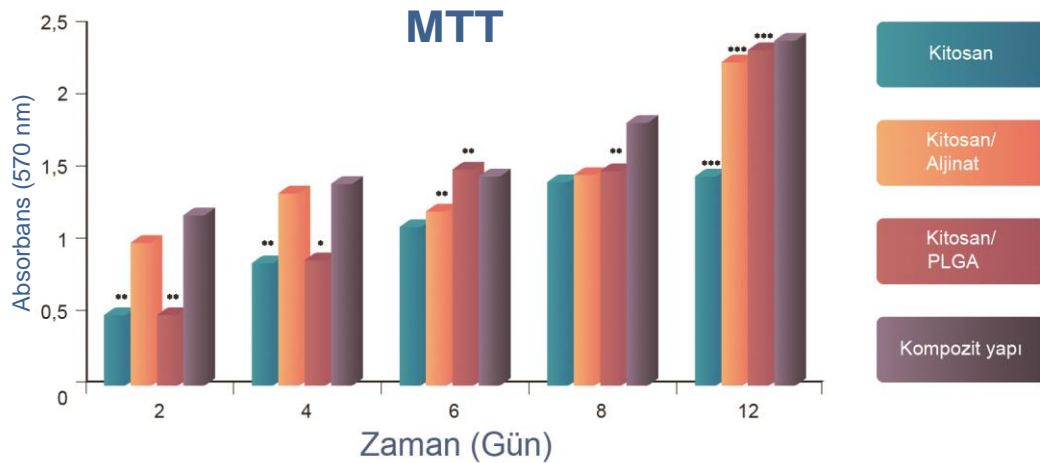


Şekil 4.6.1 Kitosan doku iskelesi (a) ve kompozit yapının SEM görüntüsü (b) (Yapı içerisindeki aljinat mikroküreler daire içerisine alınmıştır. Büyütülmüş fotoğrafta ise yapıya katılan nanopartiküller görüntülenmiştir).

## 4.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

### 4.7.1 Hücre Proliferasyonu

Doku iskeleleri içerisinde bulunan hücrelerin, çoğalması ve metabolik aktiviteleri 12 gün boyunca incelendi ve elde edilen MTT sonuçları 570 nm'de absorbans değerleri olarak verildi (Şekil 4.7.1).

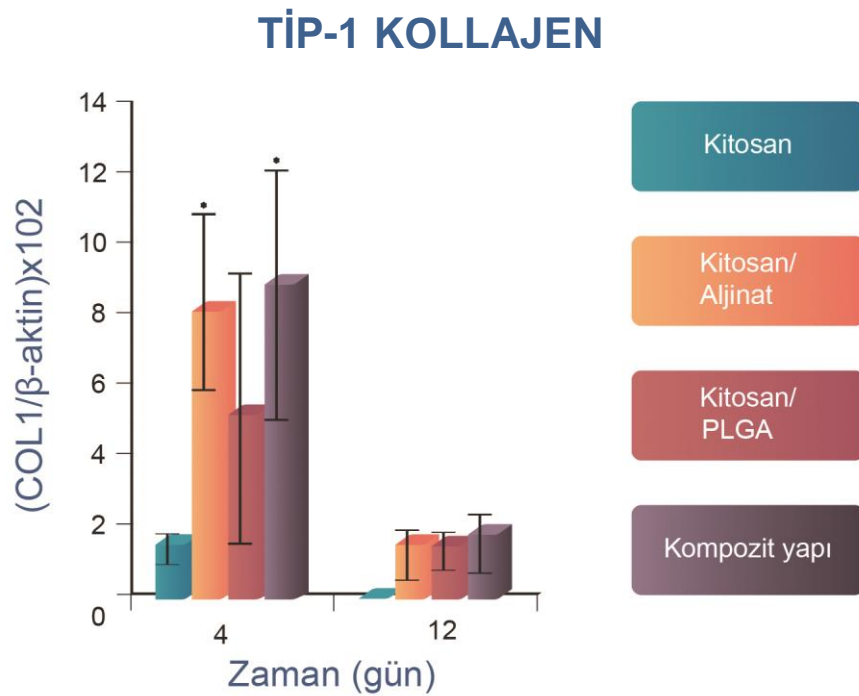


Şekil 4.7.1 Sementoblast hücrelerinin MTT analizi.

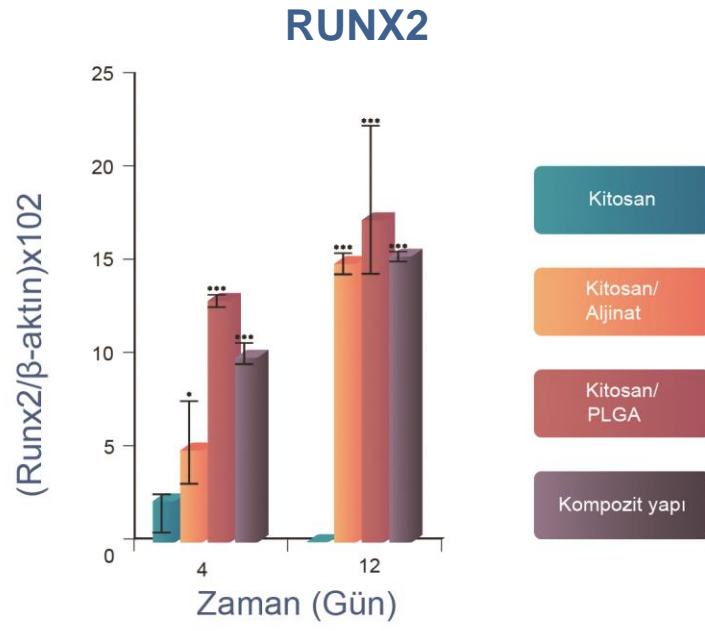
MTT bulgularına göre; tüm zamanlarda kitosan gruba göre diğer gruplarda anlamlı olarak belirgin düzeyde daha yüksek metabolik aktivite gözlemlendi. İkinci ve 4. günlerde Kitosan/Aljinat grubunda ve kompozit yapıda MTT değerlerinde belirgin artış gözlemlendi. Altıncı günden sonra Kitosan/PLGA grubu ve kompozit yapıdaki artış kademeli olarak izlendi. Sekizinci günde en yüksek hücre sayıları kompozit yapı grubunda kaydedildi. On ikinci günde en düşük sementoblast sayıları kitosan grubunda gözlenirken, diğer gruplarda benzer hücre çoğalması kaydedildi.

#### 4.7.2 Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

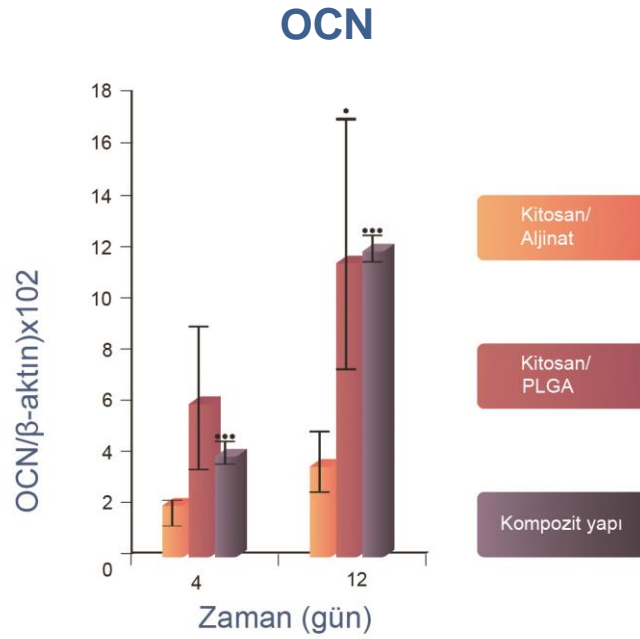
Sementoblast hücrelerinin osteojenik farklılaşması, kültürün 4. ve 12. gününde 3 farklı genin (OCN, Runx2 ve tip-I kollajen) ifadeleri değerlendirilerek belirlendi (Şekil 4.7.2). Tüm bu genlerin ifade seviyeleri, karşılaştırma yapabilmek amacıyla kontrol geni olan  $\beta$ -aktin ifade seviyesi ile normalize edildi.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7.2 Kültürün 4. ve 12. günlerinde elde edilen (a) Tip-I kollajen, (b) *Runx2* ve (c) osteokalsin (OCN) gen ifade seviyelerini gösteren RT-PCR analizi sonuçları.



Büyüme ve farklılaşma faktörlerinin olduğu gruplarda kitosan grubuna yani kontrol grubuna göre yüksek düzeyde gen ifade düzeyleri belirlendi.

Tip-I kollajen gen ifadelerine bakıldığında; 4. günde kitosan ve kitosan/PLGA grubuna kıyasla kitosan/aljinat ve kompozit yapıda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Kitosan/aljinat ve kompozit yapı arasındaki fark anlamlı bulunmadı. On ikinci günde kitosan gruba göre diğer gruplarda gen ifade seviyeleri yüksek bulunurken, gruplar arasında anlamlı bir fark kaydedilmedi.

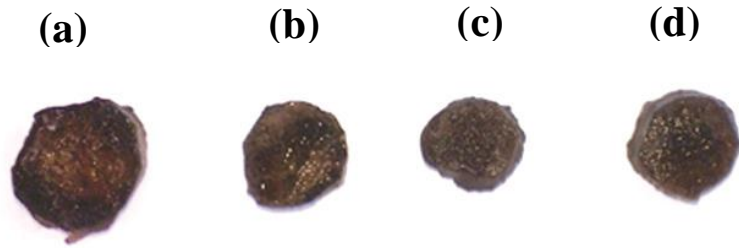
Runx2 gen ifadeleri kıyaslandığında; 4. günde belirgin artış kitosan/PLGA grubunda saptandı. Kitosan/ aljinat grubu ile kitosan/PLGA grubu kıyaslandığında, kitosan/PLGA grubunda gen ifade seviyelerinde 3 kat artış olduğu kaydedildi. On ikinci günde büyüme ve farklılaşma faktörlerinin yüklü olduğu gruplarda kitosan gruba istatistiksel olarak daha yüksek gen ifade seviyeleri saptanırken, gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

OCN gen ifadeleri değerlendirildiğinde; kitosan grubunda tüm zamanlarda gen ifadeleri tayin edilemezken, 4. günde kitosan/PLGA grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı artış gözlemlendi. Kompozit grubuna ait gen ifade seviyeleri kitosan/aljinat grubuna kıyasla 2 kat daha fazla bulundu. On ikinci günde kitosan/PLGA ve kompozit yapıdaki artış kitosan/aljinat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kaydedilirken, kitosan/PLGA grubu ile kompozit yapı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

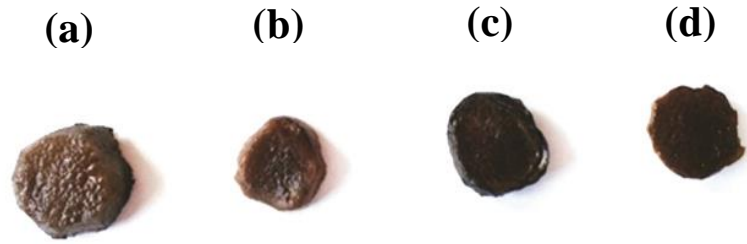
### **4.7.3 Mineralizasyon**

Osteoblastik farklılaşmanın ve mineral-benzeri nodül oluşumlarının gösterilmesi amacıyla 8. gün ve 12. günlerde yapılan von Kossa boyamalarının sonuçları Şekil 4.7.3'de gösterilmiştir. Matristeki kalsifikasyonun belirlenmesine yönelik bir analiz şekli olan von Kossa testinde, kalsiyum fosfat tuzları kahverengi-siyah renkte boyanarak görünür hale gelmektedir. Şekil 4.7.3'e bakıldığında her grup için farklı derecelerde kahverengi

boyanma olduğu görüldü. Sekizinci ve 12. günlerde tüm gruplarda boyanma olmasına rağmen, kitosan/PLGA grubunda ve kompozit yapıda beklenildiği gibi makroskopik olarak belirgin koyu renk boyanmanın dikkat çekici düzeyde olduğu kaydedildi.



### 8. GÜN



### 12. GÜN

Şekil 4.7.3 Hücre kültürünün 8. ve 12. günlerine ait von Kossa boyama sonuçları. (a) Kitosan grubu, (b) Kitosan/Aljinat grubu, (c) Kitosan/PLGA grubu, (d) Kompozit yapı

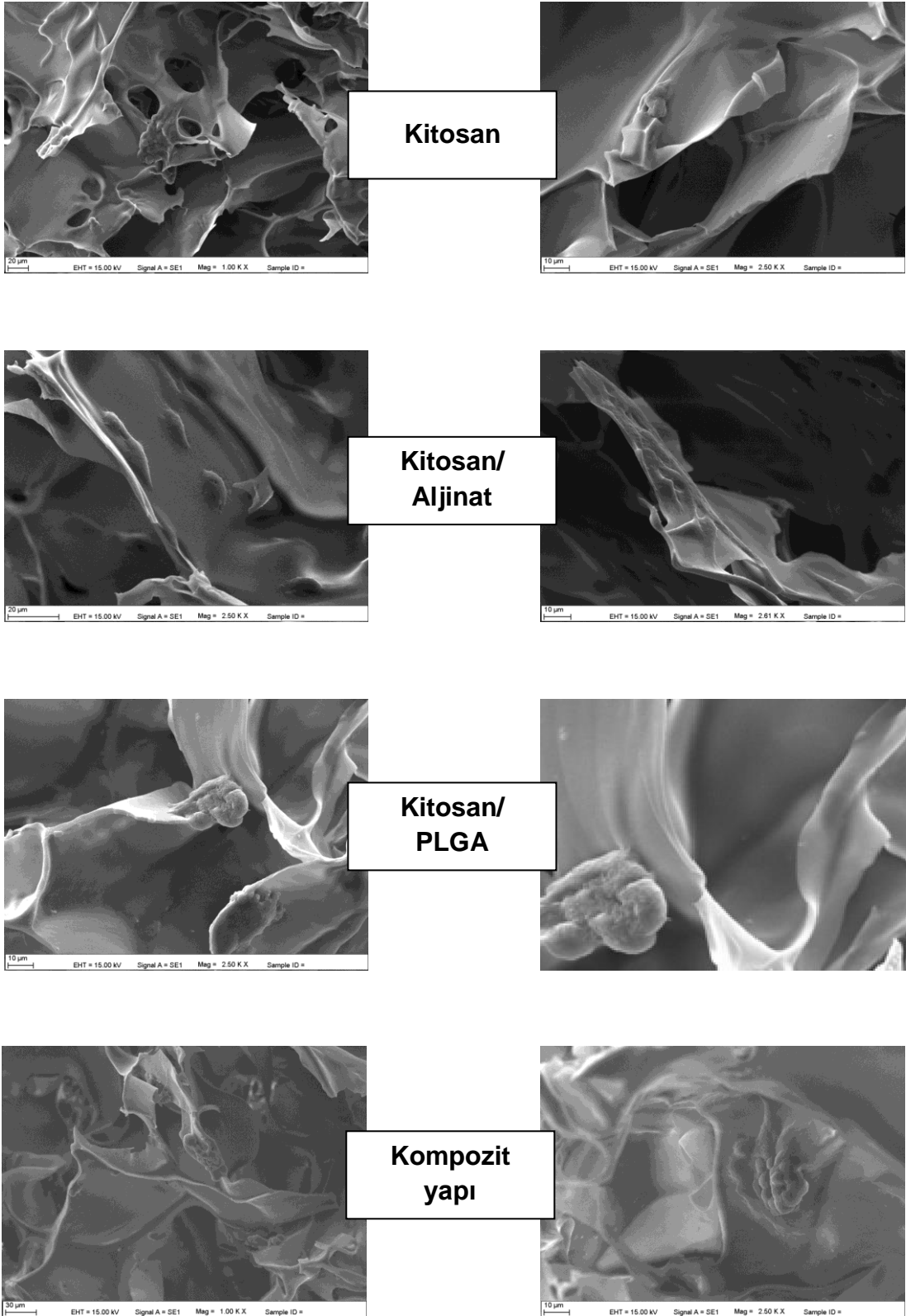
#### 4.7.4. Hücre Morfolojisi

Kitosan, kitosan/aljinat, kitosan/PLGA ve kompozit yapı içerisindeki sementoblast hücrelerinin morfolojileri, dağılımları ve davranışları kültürün 2, 4, 8. günlerinde SEM ile incelendi (Şekil 4.7.4-8).

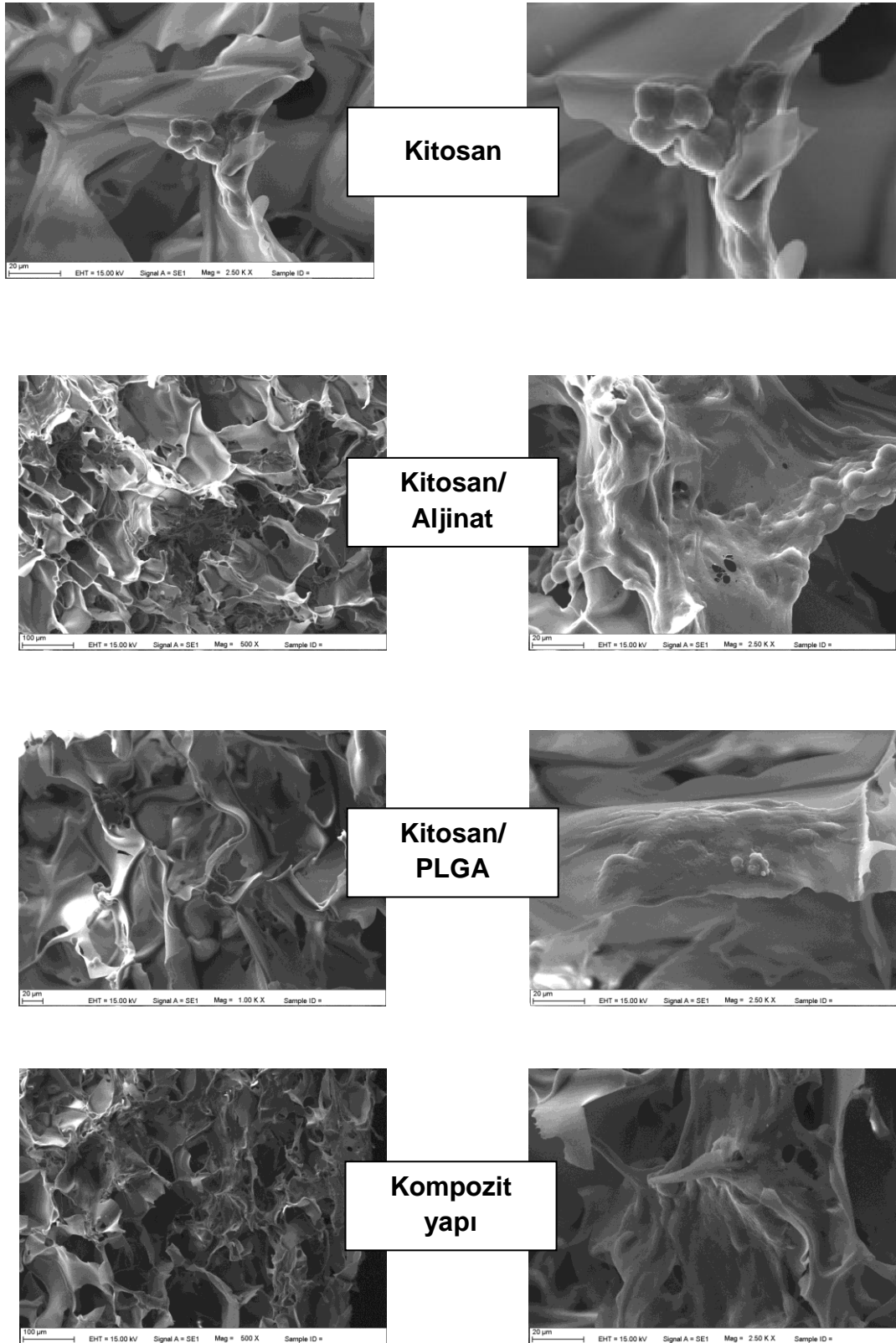
İkinci günde elde edilen SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, kompozit yapıya kıyasla diğer gruplarda hücresel yayılımın daha düşük olduğu ve doku iskelesi gözeneklerinin izlenebildiği saptandı. Kompozit yapı ve kitosan/PLGA gruplarında boş gözeneklerin daha az izlendiği ve yüzeyde daha çok hücre olduğu kaydedildi. Kompozit yapıda doku iskeleleri yüzeyinde sementoblastların daha yoğun hücresel uzantılar ile doku iskelesi yüzeyine yerleşmiş oldukları gözlemlendi. İkinci gün görüntülerinde az miktarda ECM sentezi belirlenirken mineralize nodül oluşumu tespit edilmedi.

Dördüncü günde elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm gruplarda 2. güne göre hücre sayısının arttığı ve sentezlenen ECM'ye bağlı olarak doku iskelesi gözeneklerinin daha az izlendiği kaydedildi. Kompozit yapıda yüzeye hücresel uzantılarıyla tutunmuş sementoblastlar daha yoğun olarak izlendi. Diğer gruplara kıyasla kompozit grupta gözeneklerin daha az izlendiği belirlendi.

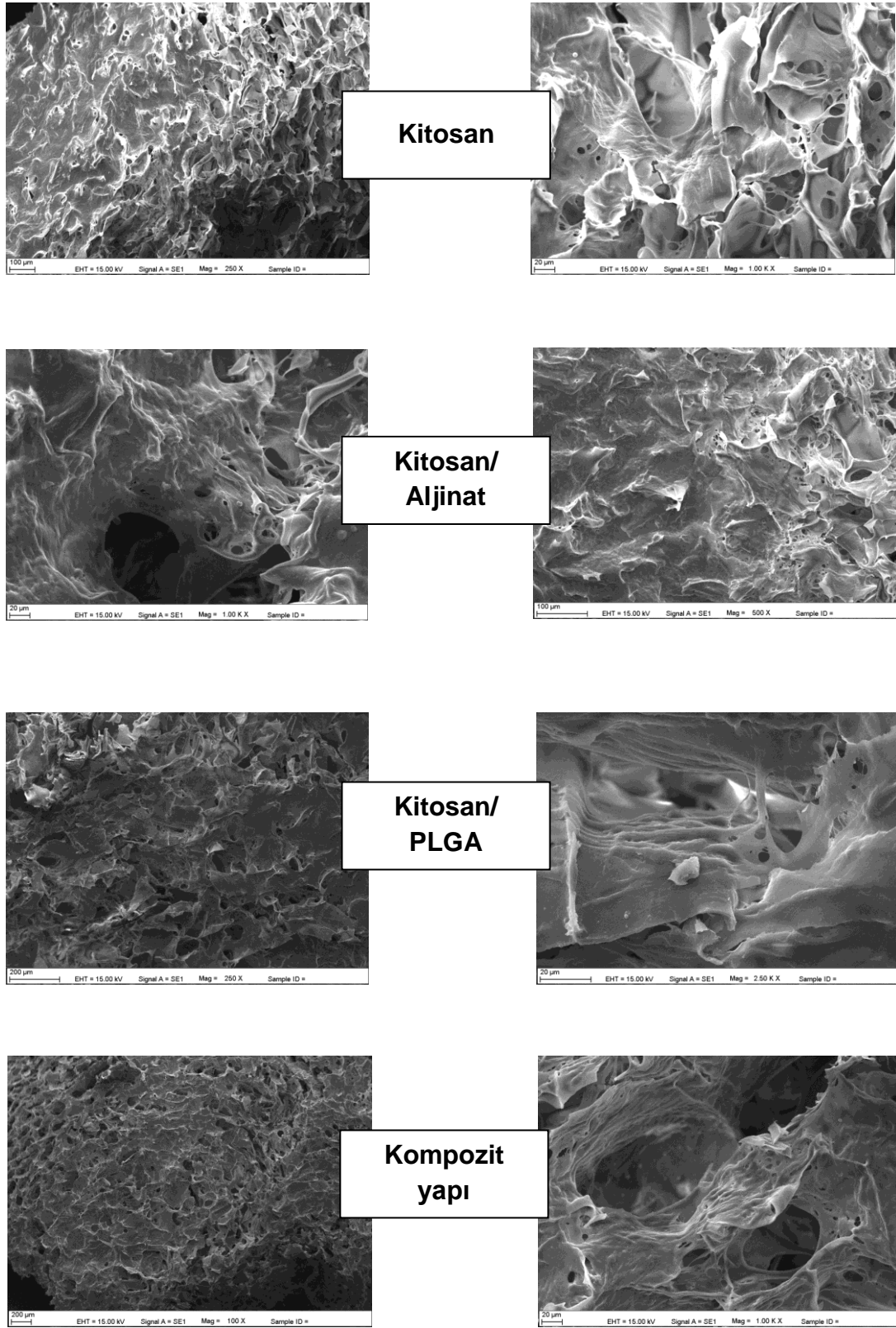
Sekizinci günde elde edilen SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, tüm gruplarda 4. güne kıyasla gözenekli yapının daha az görünür hale geldiği saptandı. Özellikle kompozit yapıda yüzeyel gözeneklerin tamamen hücreler ve oluşan doku ile örtüldüğü görüldü. Tüm gruplarda sentezlenmiş matriks yüzeyinde yeni oluşmuş amorf nodüller izlendi. Kompozit yapıda oluşan amorf nodüllerin daha yoğun olduğu kaydedildi. Birinci haftada, kompozit yapının büyük bir kısmının yeni oluşan matriksle kaplandığı gözlemlendi. MTT analizleri ile SEM bulguları kıyaslandığında gruplar arasında söz konusu günlerde hücre sayısı açısından belirgin fark olmadığı görüldü.



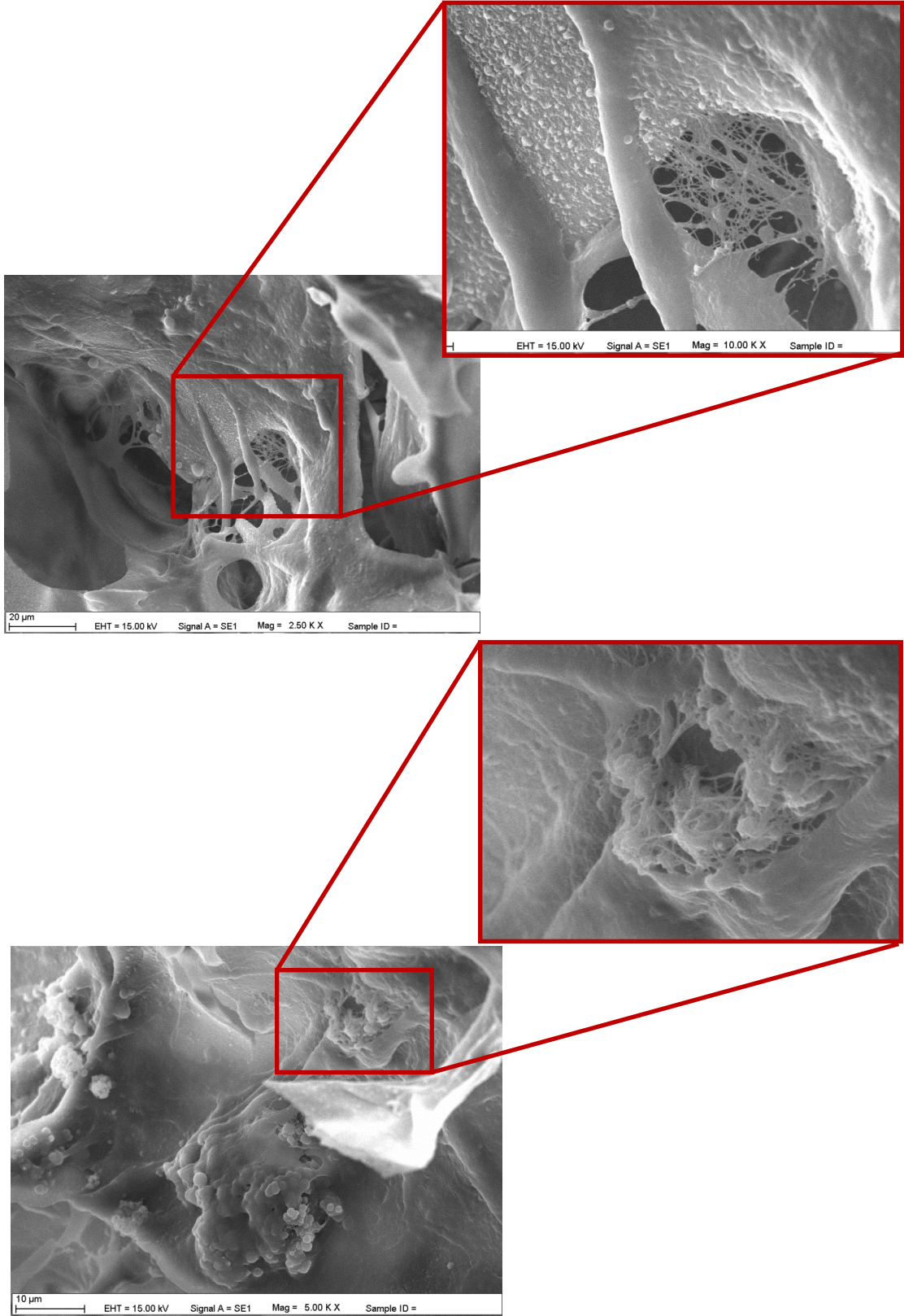
Şekil 4.7.4 Hücre Kültürü Deneyleri- Morfoloji-SEM-2. Gün.



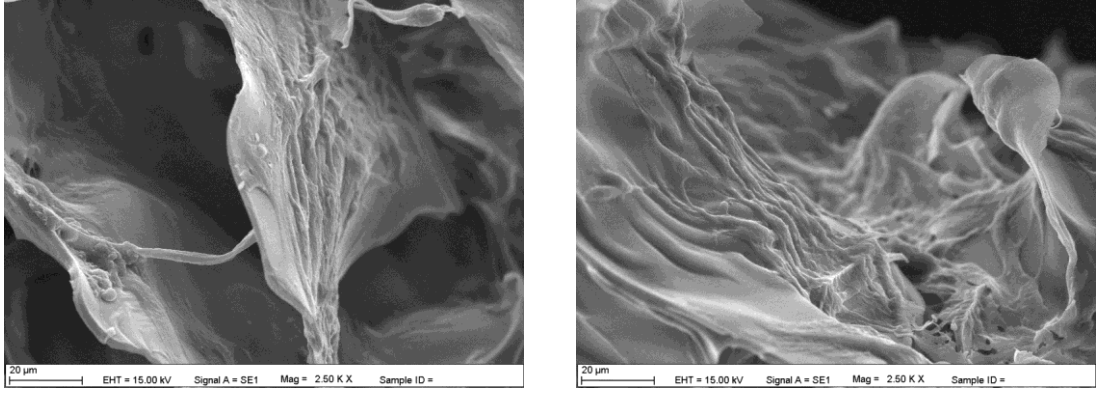
Şekil 4.7.5 Hücre Kültürü Deneyleri- Morfoloji-SEM-4. Gün.



Şekil 4.7.6 Hücre Kültürü Deneyleri- Morfoloji-SEM-8. Gün.



Şekil 4.7.7 Kompozit yapı içerisine ekilmiş sementoblastların 8. gündeki SEM görüntüleri-enine kesit.



Şekil 4.7.8 Kompozit yapı içerisine ekilmiş Sementoblast hücrelerinin 8. gündeki SEM görüntüleri-boyuna kesit.



## 5. TARTIŞMA

Günümüzde otojen kemik, allogreftler, alloplastik materyaller travma, enfeksiyon gibi nedenlerden kaynaklanan doku kayıplarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu materyaller kullanılarak yapılan tedavilerle periodontal yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkileyen bir takım faktörlerden ötürü çoğu zaman başarılı sonuçlar elde edilememekte ve bu materyallerin kullanımıyla periodontal rejenerasyon açısından başarılı ve öngörülebilirliği olan tedavilerin geliştirilebilmesi de olumsuz yönde etkilenebilmektedir( 106).

Periodonsiyum farklı karakterde hücreleri barındıran sert ve yumuşak dokuların bir arada bulunduğu karmaşık bir yapıdır. Bu karmaşık yapıya ek olarak, mevcut doku kaybının komşuluğunda avasküler yapıya sahip diş kökünün bulunması ortamda bulunan hücrelerin ve matris yapısının fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemekte ve bu sürecin daha da karmaşık hale dönüşmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla, periodontal doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak hücrelerin, doku iskelesinin ve biyolojik moleküllerin doğru belirlenmesi uygulanacak rejeneratif işlemlerin başarısı için temel ve en önemli basamaktır. Bu nedenle ilk olarak amaca uygun hücre ve/veya hücre grupları belirlenmeli, bu süreçte hücre fonksiyonlarını düzenleyecek biyolojik moleküllerin uygulama süreleri ve dozları da biyolojik temele uygun olarak dikkatlice seçilerek yönlendirilmelidir. Tüm bunlara ek olarak, kullanılacak doku iskelesi de hücrelerin ve büyüme faktörlerinin fonksiyonlarını destekleyecek fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalıdır.

Bu bilgiler ışığında, yaptığımız bu çalışmada, doku mühendisliği uygulamalarında başarılı ve öngörülebilir etkileriyle gündeme gelen kitosan doku iskeleleri kullanılarak, doğal süreci taklit edecek şekilde büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrollü ve ardışık salımının periodontal rejenerasyon sürecindeki olası etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmamızda kontrollü ve ardışık salımın rejeneratif potansiyelini değerlendirmek amacıyla büyüme ve farklılaşma faktörleri olarak IGF-I ve

BMP-6'nın kullanımına karar verilmiştir. IGF-I; osteoblastların büyümesini hem de pre-osteoblastların osteoblastlara farklılaşmasını sağlayarak kemik hücre metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olmakla birlikte hücre dışı matris sentezini artırmakta ve ek olarak sementoblast çoğalmasında, fenotipik gen ifade seviyelerini ve mineralizasyonunu etkilemektedir (62, 64, 65). Chen ve diğ. (96)'nin PDL hücrelerini kullanarak yapmış oldukları çalışmada, IGF-I ve BMP-2'nin mikroküreler yardımıyla ardışık ve kontrollü olarak salımı sağlanmış ve kontrol grubuna kıyasla ALP aktivitesinde, OCN ve OPN üretiminde anlamlı artış kaydedilmiştir. Kim ve diğ.(107)'nin yapmış oldukları bir diğer çalışmada, jelatin mikroküreler ve kitosan kullanılarak IGF-I ve BMP-2'nin kontrollü ve ardışık salımı sağlanmış ve kompozit grupta daha yüksek ALP aktivitesi gösterilmiştir. Raiche ve diğ. (108)'nin yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise, yine IGF-I ve BMP-2'nin ardışık salımı sağlanmış ve bu salımın kemik iliği stroma hücrelerinin cevabını pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir. Literatürde IGF-I'in kontrollü ve ardışık salımda farklı BMP'lerle birlikte sinerjistik etki oluşturarak periodontal rejenerasyonu indüklediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

TGF- $\beta$  ailesinin üyelerinden biri olan BMP grubu, kemik dokusu için en önemli protein gruplarından biridir. Yapılan farklı çalışmalarda, tedavi amaçlı olarak periodontal hasarlı bölgede BMP-2'nin kullanılmasıyla, alveol kemiği oluşumunda önemli bir artış gözlenirken sement rejenerasyonundaki etkisinin daha az olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle periodontal sert doku üzerine yapılan araştırmalarda en sık kullanılan büyüme/farklılaşma faktörünün BMP-2 olduğu anlaşılmaktadır (109). BMP-2'nin yanı sıra BMP-7'nin de özellikle sement üzerindeki olumlu etkileri yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (110). Bu araştırmaların sonuçları ile BMP-2 ve BMP-7' nin periodontal rejenerasyonda büyük bir öneme sahip oldukları ve bu proteinlerin periodontal doku mühendisliği çalışmalarında en çok tercih edilen BMP grubu büyüme faktörleri oldukları belirtilmiştir. Ancak, Ebisawa ve diğ. (111) tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada, BMP-6'nın üç farklı osteoblast hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiş ve ALP seviyesini önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, BMP-6'nın kemik hücrelerine farklılaşmada ve

çoğalmada BMP-2 ve BMP-7 kadar önemli bir rol aldığı bulgusu vurgulanmıştır. Grubumuzca yapılan bir çalışmada da BMP-6'nın kitosan doku iskelelerine emdirilmesiyle elde edilen yapıda, MC3T3-E1 hücre hattının osteojenik farklılaşması üzerine etkileri incelenmiştir. Literatürde BMP-6'nın iskelelere yüklenmesi hakkında çok bilgi bulunmaması nedeniyle önemli olan bu çalışmanın sonucunda, BMP-6'nın hücre farklılaşması için uygun hücre dışı matris ortamını oluşturduğu ve hücre aktivitelerini artırdığı görülmüştür. Sonuç olarak, BMP-6'nın kemik doku mühendisliği için önemli bir biyolojik ajan olduğu vurgulanarak periodontal yıkımın geri kazanımı için doğru bir biyosinyal molekülü olabileceği ileri sürülmüştür (80). Yapılan çalışmalarda, büyüme faktörlerinin çoklu salımı eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiş olup, periodontal rejenerasyona yönelik hücre büyüme ve farklılaşma faktörlerinin ardışık salımının incelendiği bir sistem mevcut değildir. Bu kapsamda geliştirilecek sistemlerle birlikte kontrollü ardışık salımın sağlanması ve buna ek olarak, bu süreçte hem hazırlayıcı (competence) hem de ilerletici (progression) faktörün bir arada bulunması, doğal sürece uygun olması nedeniyle daha yararlı olacaktır. Ayrıca, yapılan çalışmalardan farklı olarak seçilecek büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kombine kullanımında muhtemel mekanizmalarının ve hücreler üzerine olan etkilerinin belirlenmesi bilimsel literatüre katkı sağlayacaktır. Bilgilerimiz kapsamında literatürde IGF-I ve BMP-6'nın kontrollü ve ardışık salımının sementoblastlar üzerinde etkilerinin değerlendirildiği *in vitro* bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışma kapsamında öncelikle IGF-I salımını kontrollü ve ardışık olarak sağlayacak aljinat mikrokürelerin üretimi gerçekleştirildi. Materyal olarak aljinat seçilmesinin nedeni; erken dönem farklılaşmayı sağlayan, başlatıcı (competence) faktör olarak IGF-I'in öncü salımını sağlayacak şekilde aljinatın biyobozunurluğunun kısa sürede gerçekleşmesi özelliğine dayanmaktadır. Aljinat mikroküre üretiminde farklı birçok yöntem kullanılmaktadır. Emülsifikasyon metodu bunlardan biri olmakla birlikte yerçekimi etkisi, koaksiyal hava/sıvı akışı, titreşen kapiller borular, rotasyon sistemleri ya da elektrostatik potansiyel gibi çeşitli yöntemler kullanılarak aljinat çözeltisinin çapraz bağlayıcı bir ajana damlatılmasıyla da mikroküre

üretimi mümkündür (112). Ancak bu teknikler arasından en çok kullanılanlar karıştırıcı ortamda emülsifikasyon tekniği ile mikroküre sentezlenmesi (113), multivalent katyonlardan birinin çözeltisine (en çok kullanılan  $\text{CaCl}_2$ ) sıvı aljinatın damlatılması ile mikroküre sentezlenmesi (114) ve elektrospreyleme tekniği ile mikroküre sentezidir (115).

İlk yöntem olan emülsifikasyon tekniği ile mikroküre sentezlenmesinde uygun boyutlarda mikroküre üretilmesine karşın, kullanılan organik çözeltilerin ortamdaki yeterince uzaklaştırılmaması ve bu nedenle toksik özellik göstermesi en önemli problemlerden biridir. Ayrıca, yapılan çalışmalarla bu yöntemle üretilen mikrokürelerde küre formunun bozuk ve çap dağılım oranlarının yüksek olduğu kaydedilmiştir (113). Multivalent katyonlarla çapraz bağlama tekniği ise üretilen mikrokürelerin çapları genellikle 1 mm'den büyük olmakta ve kürelerde kümeleşme görülebilmektedir (114). Her iki yöntemde de aljinat konsantrasyonu düşük çözeltilerle çalışılmaktadır. Bu durum, mikroküre dayanıklılığı ve hızlı salım profili sergilemesi nedeniyle de doku mühendisliği uygulamalarında çeşitli sorunlar çıkarabilmektedir. Elektrospreyleme ise mikroküre boyutunu küçültmek için kullanılan en önemli tekniklerden biridir. Bu yöntemdeki en önemli sorun mikroküre koşullarının optimizasyonundaki zorluklardır (115).

Çalışmamızda aljinat mikrokürelerin üretiminde elektrospreyleme yöntemi kullanıldı. Sill ve diğ.(100)'nin yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarına göre elektrospreyleme yönteminde mikroküre boyutuna etki eden parametreler voltaj, polimer akış hızı ve şırınga-toplayıcı arasındaki mesafe olarak belirlenmiştir. Burdan yola çıkarak araştırmamızda gerçekleştirilen öncül çalışmalar sonucunda optimum koşullar; voltaj 20 kV, akış hızı 10mL/sa ve şırınga-toplayıcı arasındaki mesafe 10 cm olarak belirlenerek aljinat mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Kontrollü salım sistemlerinde, mikroküre boy ve boy dağılımının homojen olması büyük bir öneme sahiptir. Örneğin küçük boyuttaki mikroküreler, zayıf kapsülasyon verimliliğine sahip olmaları nedeniyle uzun süreli salım mekanizması için uygun bir ajan olarak görülmemektedirler. Diğer taraftan büyük boyuttaki

mikrokürelerde ise yüklenme oranlarına bağımlı olarak hızlı salım görülmekte; boyutlarına bağılı olarak da hedeflenen bölgeye taşınmalarında sorunlar meydana gelmektedir (116). Yapılan çalışmalar kapsamında kürelerin boyutları ışık mikroskobu altında değerlendirilerek  $296\pm 18$   $\mu\text{m}$  bulundu. Eş boy dağılımına sahip oldukları standart sapma değerleriyle gösterildi. Bulunan bu değerler Soran ve diğ.(99)'nin çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir.

Materyallerin şişme özellikleri *in vivo* uygulamalarda doku sıvılarıyla etkileşim düzeylerini belirlemektedir. Aşırı şişme özelliği gösteren materyaller fazlaca boyut değiştirdiklerinden *in vivo* uygulamalarda problem yaratabilirler. Aljinat mikrokürelerin üretimi tamamlandıktan sonra liyofilizasyon yöntemiyle kurutuldu ve kuru haldeki küreler PBS (pH:7.4) içerisine alınarak şişme deneyleri yürütüldü. Beş dakikada hızlı bir şekilde şişen ve yaklaşık 2. saat sonunda denge şişmesine ulaşan kürelerin şişme özelliklerinin geri dönüşümlü olduğu belirlendi. Kompozit yapı oluşturma aşamasında aljinat mikroküreler yapıya kuru olarak katıldığı için kürelerin şişme özelliklerinin geri dönüşümlü olması büyüme faktörlerinin salınabilmesi açısından önemli olmaktadır. PBS tamponu (pH:7.4) içerisinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen mikrokürelerin biyobozunurluğu da değerlendirildi. Kürelerin 48 saat boyunca yapılarını koruduğu, 72 saat sonunda bozunmaya başladıkları belirlendi. Mikroküreler ardışık salımı gerçekleştirecek büyüme faktörlerinden erken dönemde etkileri beklenen IGF-I'in salımından sorumlu olduklarından elde edilen bu veriler aljinat mikrokürelerin başlatıcı faktör (competence) olan IGF-I için uygun taşıyıcı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın devamında BMP-6 salımını kontrollü ve ardışık olarak sağlayacak PLGA nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirildi. PLGA nanopartiküller (10nm–100nm) yüksek aktif madde yükleme kapasitesine sahiptir. Hapsettikleri aktif maddenin hedefe ulaşana kadar bozunmasını engelleyerek salımın kontrollü ve sürekli olmasını sağlarlar. Nanopartiküllerin üretiminde sentetik ve doğal polimerlerden oluşan biyokompozitler, sahip oldukları fizikokimyasal özellikler ve sentetik polimere uygulanan çoğu işleme

tekniki ile üretilebilmeleri açısından geniş bir uygulama alanına sahiptirler (117).

Çalışmamızda kullanılan PLGA, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nce (FDA) onaylanmış, poliester bazlı poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA) ve kopolimerleridir. Toksisitesi ve güvenilirliği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (117). PLGA biyobozunur polimerlerin altın standardı olarak kabul edilir ve geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Nanopartikül sentezinde halihazırda kullanılan bir çok yöntem bulunmaktadır. Çalışmamızda PLGA nanopartiküller emülsiyon-difüzyon-evaporasyon yöntemi kullanılarak üretildi. Söz konusu yöntem kolay olması, farklı birçok maddeye uygulanabilir olması ve yüksek verimli sonuçlar elde edilebilmesi sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir (118).

Çalışmamız kapsamında PLGA nanopartiküllerin üretiminden sonra karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Nanopartikül üretiminde homojen partikül boyutu eldesi için genellikle poli (vinil alkol) (PVA) gibi stabilizatörler kullanılmaktadır. Ancak, kullanılan stabilizatörlerin oluşan partikül yüzeyinden uzaklaştırılması oldukça zordur. Yüzeyden uzaklaştırılmayan stabilizatörün, biyolojik sistemlerde toksik etkiye neden olması ve polimerin bozunma rejimini etkilemesi nedeniyle stabilizatör veya yüzey aktif madde kullanmadan nanopartikül üretimi tercih edilmektedir (119).

Didodesildimetilamonyumbromür (DMAB), katyonik dördüncül amonyum yüzey aktif maddeleri sınıfına ait çift zincirli bir yapıdır. PLGA nanopartikül üretilen bir çalışmada DMAB ve PVA'nın partikül büyüklüğüne etkisine bakılmış ve DMAB'nin bulunduğu çözeltilerdeki nanopartiküllerin daha küçük boyuta sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, DMAB konsantrasyonunun tek başına enkapsülasyon verimine ve partikül büyüklüğüne anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Stabilizatör konsantrasyonundan çok tipinin partikül büyüklüğü ve Zeta potansiyeline etki ettiği sonucuna varılmıştır (120). Çalışmamızda PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı analizi "Zetasizer" ile gerçekleştirildi. Üretilen nanopartiküllerin boyutları 1232 nm ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) 0.6

olarak bulundu. Çekilen SEM görüntüleri de partiküllerin büyüklükleri, yoğunlukları ve yüzey morfolojileri hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağladı. SEM görüntüleri partikül boyutu açısından incelendiğinde boyutları  $1311\pm 319$  nm olarak hesaplandı ve Zetasizer'dan elde edilen sonuçları destekler nitelikte bulundu. SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, üretilen nanopartiküllerin yuvarlak bir morfolojiye sahip oldukları ve yüzeylerinde herhangi bir pürüzün yer almadığı görüldü. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında üretilen partiküllerin, hem kimyasal hem de fiziksel yapılarının literatürde yer alan bilgilerle paralellik gösterdiği saptandı (101).

Literatürde yapılan salım çalışmalarında *in vitro* salım kinetiklerinin belirlenmesinde BSA kullanılmaktadır (121-123). Çalışmamızın takip eden aşamasında literatüre uygun olarak BSA ile öncül salım çalışmaları yapıldı. BSA yüklenmiş aljinat mikrokürelerin öncelikle enkapsülasyon verimleri hesaplandı. Nanodrop kullanılarak yapılan bu işlemde enkapsülasyon verimi % 40 olarak bulundu. Aljinat mikroküreler üretim aşamasından sonra salım kinetiği incelendiğinde enkapsüle edilen BSA'nın yaklaşık % 60 oranının ilk 24 saat içerisinde salındığı belirlendi. Tasarlanan sistemde, IGF-I yüklü aljinat mikroküreler kitosan doku iskelelerine emdirilerek sonrasında IGF-I'in önce aljinat mikrokürelerden ve daha sonra da kitosan doku iskelesinden salınması planlandı. BSA'nın aljinat mikrokürelerden büyük oranda ilk 24 saatte salınmış olması, aljinat mikrokürelerin periodontal doku rejenerasyonunun erken döneminde görev alan IGF-I'in salımı için uygun bir malzeme olduğu fikrini destekledi. PLGA nanopartiküllere yüklenen BSA'nın yine öncelikle enkapsülasyon verimi belirlendi. NanoDrop ile yapılan ölçümler sonrasında enkapsülasyon verimi % 10 olarak hesaplandı. Salım kinetiği incelendiğinde enkapsüle edilen BSA'nın yaklaşık 30 gün boyunca kontrollü olarak salındığı ve salınan miktarın da, yüklenen BSA'nın yaklaşık % 80'i olduğu belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda PLGA'nın, kemik doku iyileşmesindeki uzun dönemli etkileri gösterilmiş olan BMP-6'nın kontrollü ve uzun süreli salımında kullanılabilecek uygun bir malzeme olduğunu destekledi. Ancak yapılan çalışmada, enkapsülasyon verimi literatürdeki çalışmalardan daha düşük bulundu (124). Bu nedenle çalışmamızın bir

sonraki aşamasında büyüme faktörünün yapıya katılması için, sulu faz yerine organik fazın kullanılmasına karar verilerek çalışmanın devamında sistemin bu şekilde değiştirilerek uygulanması sağlandı.

Çalışmamızın devamında kompozit yapının oluşturulması işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk aşamada kitosan doku iskeleleri sentezlendi. Kontrollü salım sistemlerinde ve doku iskelelerinde, üzerinde en çok çalışılan biyopolimerlerden biri kitosandır. Doku mühendisliği uygulamalarında kitosanın doku destek malzemesi olarak seçilmesinde biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kolaylıkla kontrol edilebilmesi, biyouyumluluğu, antibakteriyal ve hidrofilik özellikleri ve enzimatik olarak parçalanabilmesi gibi parametreler en önemli nedenlerdir (125). Grubumuzca daha önce gerçekleştirilen çalışmalar doğrultusunda, kitosan doku iskelesi için en uygun üretim parametrelerinin  $> \% 85$  deasetilasyon derecesine ve  $\% 2$  (w/v) bileşimine sahip kitosan olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan ile hazırlanan doku iskelelerinin yüksek içsel bağlantıya ve düşük biyobozunurluk oranına sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak, fibroblastik hücre tutunması ve üremesinde de daha iyi sonuçlar alındığı belirlenmiştir (102). Çalışmamızda Tıgılı ve diğ. (102) tarafından belirlenen parametreler doğrultusunda hazırlanan ve liyofilizatörde kurutularak üretilen gözenekli kitosan doku iskelelerine ait SEM fotoğrafları alındı. Yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla içsel bağlantılar içeren ve 30-150  $\mu\text{m}$  arasında değişen gözenek büyüklüğüne sahip yapılar oldukları belirlendi ve iskelelerin  $\% 80$  gözenekliliğe sahip oldukları sonucuna ulaşıldı. Çalışmamızın sonuçları Tıgılı ve diğ.'nin bulguları ile uyumlu bulundu (102).

Yüksek gözeneklilik oranı ve birbiri ile bağlantılı gözenek oluşumu doku mühendisliği çalışmaları için istenen özelliklerdir. Çünkü doku iskelelerinin birbiriyle bağlantılı (interconnected) gözeneklere sahip olması hücrelerin yayılması, besin maddelerinin taşınımı ve vasküler dokuların iskelenin içerisine doğru göç etmesi bakımından oldukça önemlidir (126, 127). Ek olarak nanopartiküllerin doku iskelelerine yüklendiği durumlarda da; üretim sırasında gözeneklere yerleşen partiküllerden salınan maddenin



istenilen bölgeye ulaşabilmesi için gözeneklerin birbiri ile bağlantılı olması gerekmektedir. Gözenek boyutu açısından ele alındığında, gözeneklerin çok küçük olması durumunda gözenekler hücreler tarafından tıkanacak; bu da hücre penetrasyonu, ECM oluşumu ve doku iskelesinin iç kısımlarının vaskülerize olmasını engelleyecektir (22). Çalışma grubunca daha önceden yapılan deneylerle en uygun yükleme yöntemi olarak belirlenen yöntemle, PLGA nanopartiküller kitosan doku iskelesinin üretim aşamasında yapıya entegre edildi (128). İkinci aşamada ise mikroküreler yapıya katıldı. Mikrokürelerin doku iskelelerine yüklenmesi için, çözeltiye karıştırma (129), doku iskelesine emdirme (130) ve füzyon (123) gibi farklı teknikler kullanılmaktadır. Kitinin deasetilasyonu sonucu yapıdaki asetamit, birincil amin grubuna dönüşmekte ve buna bağlı olarak kitosan, hidrofilik karakter kazanmaktadır. Kitosanın bu özelliği nedeniyle, yüzeyden mikrokürelerin emiliminin daha iyi olacağı düşünülmüştür (102). Elde edilen sonuçlarla nanopartiküllerin ve mikrokürelerin yapıya katıldıktan sonra, yapı içerisinde homojen olarak dağıldığı ve gözenek yapısına herhangi bir şekilde zarar vermediği belirlenmiştir. Ek olarak liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan iskelelerin tekrar PBS içerisine alındığında 3 dakika gibi kısa bir sürede denge şişmeye geldikleri gözlenmiş ve şişme oranı %  $36.7 \pm 0.2$  olarak hesaplanmıştır. Doku iskeleleri uygulandıkları bölgelere bağlı olarak yeterli fiziksel direnci göstermelidirler. Özellikle yük taşıyan bölgelere kullanılan biyomateryallerin yüksek fiziksel stabiliteye sahip olmaları yapısal bütünlüklerini ve fonksiyonlarını koruyabilmeleri açısından büyük önem kazanmaktadır. Çalışmamızda yapılan mekanik testler sonucu doku iskelelerinin elastik modülü  $0.0917 \pm 0.0001$  N/m<sup>2</sup> olarak hesaplandı. Bulunan bu sonuçlar Akman ve diğ. (94)'nin çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir.

Çalışma kapsamında oluşturduğumuz bu sistemle, IGF-I gibi hazırlayıcı (competence) bir faktörün ilk aşamada ortama salınarak ortamda bulunan mevcut hücrelerin çoğalmasını desteklemesi hedeflenmiştir. Çoğalan bu hücrelerin matris sentezleyerek mineralize doku oluşturabilmeleri için geç dönemde kontrolsüzce çoğalmaya devam etmesi yerine farklılaşmaları istenir. Bu amaçla geç dönemde devreye giren ve ilerletici

(progression) faktör olarak görev alan BMP-6'nın da etkisiyle hücrelerin farklılaşması amaçlanarak doğal sürece çok yakın bir model oluşturulması sağlanmıştır.

Doku mühendisliği çalışmalarında, doku iskelelerinin büyüme ve farklılaşma faktörleri için uygun taşıyıcı sistem oluşturmalarının yanı sıra kullanılacak hücrelerin fonksiyonlarını destekleyecek üç boyutlu yapıyı oluşturmaları da önemlidir. Çalışmamızda oluşturduğumuz kompozit yapının periodontal rejenerasyona yönelik uygulamalar için kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinde sementoblastlar kullanıldı. Üretilen doku iskeleleri üzerine ekilen sementoblastların proliferasyonunun tayini için MTT analizi yapıldı.

MTT analizi için kitosan, yapısında aljinat mikroküre barındıran kitosan iskeleleri, yapısında PLGA nanopartikül içeren kitosan iskeleleri ve yapısında hem mikroküre hem de nanopartikül içeren kitosan doku iskeleleri (kompozit yapı) içerisinde sementoblastlar 12 gün süreyle kültüre edildi. Tüm zamanlarda kitosan gruba göre diğer gruplarda anlamlı olarak belirgin düzeyde daha yüksek metabolik aktivite gözlemlendi. İkinci ve 4. günlerde kitosan/aljinat grubunda ve kompozit yapı gruplarında kaydedilen artış, ortama erken dönemde salınan IGF-I'in proliferasyona etkisini belirgin bir şekilde göstermektedir. Altıncı günden sonra kitosan/PLGA grubu ve kompozit yapı gruplarındaki artış BMP-6'nın kemoatraktif etkisiyle hücre çoğalmasına ek bir katkıda bulunduğu yorumu yapılabilir.

Çalışmamızda sementoblast hücrelerinin farklılaşma özellikleri gen ifade seviyelerinin belirlenmesi ile değerlendirildi. Bu amaçla tip-1 kollajen, Runx2 ve OCN gen ifade seviyeleri kültürün 4. ve 12. günlerinde yapılan RT-PCR analizi ile belirlendi. Tip-1 kollajen alveol kemiği, periodontal ligament ve sement hücre dışı matrisinin temel yapıtaşıdır. RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, 4. günde kitosan gruba göre büyüme ve farklılaşma faktörleri içeren gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Dördüncü günde kitosan/aljinat ve kompozit yapıdaki tip-1 kollajen gen ifade seviyelerindeki artış, yapılarında bulunan IGF-I'in erken dönemde matris

sentezine olan olumlu etkilerinden kaynaklandığı düşünülebilir. On ikinci günde büyüme ve farklılaşma faktörlerini içeren gruplarda kitosan gruba göre tip-1 kollajen gen ifade seviyelerinde farklılıklar görülürken,, gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. On ikinci günde 4. güne kıyasla kitosan/aljinat, kitosan/PLGA ve kompozit gruplarında tip-1 kollajen gen ifadesinde azalma gözlemlendi. Bu azalma geç dönemde yani mineralizasyon aşamasında matris sentezi düzeyinin azalmış olması şeklinde yorumlanabilir.

Runx2 osteoblastik farklılaşmanın erken dönem temel transkripsiyon faktörü olarak kabul edilir. Farklı biyolojik ve mekanik etkilerle aktive olarak osteokalsin sentezini düzenler. Runx2 gen ifade seviyelerine bakıldığında, 4. günde kitosan/PLGA ve kompozit yapı gruplarına göre kitosan/aljinat grubunda anlamlı olarak daha düşük değerlerin görülmesi IGF-I'in baskın etkisiyle çoğalmayı artırması ve kısmen farklılaşmayı baskılaması şeklinde açıklanabilir. On ikinci günde kitosan gruba göre diğer gruplarda istatistiksel olarak belirgin artış dikkati çekmektedir. On ikinci gün Runx2 gen ifadesi değerlerine bakıldığında kitosan/PLGA ve kompozit yapıda BMP-6'nın geç dönemde hücre farklılaşması üzerine etkileri net bir şekilde görülmektedir. On ikinci günde 4. güne göre kitosan/PLGA ve kompozit gruplarda kademeli artış dikkati çekerken kitosan/aljinat grubunda belirgin bir artış kaydedilmiştir. Kitosan/aljinat grubunda artmış seviyelerdeki Runx2, IGF-I'in geç dönemde hücre farklılaşmasına olan katkısı kapsamında yorumlanabilir.

OCN, osteojenik farklılaşmanın geç döneminde ortaya çıkan, özgün osteoblast belirteçidir. Büyüme ve farklılaşma faktörlerinin etkisi görülmediğinden kitosan grubunda osteoblastik belirteç olan OCN gen ifade düzeyleri çok düşük olduğundan RT-PCR'da tespit edilemedi. Diğer gruplar kıyaslandığında 4. günde kitosan/PLGA grubunda BMP-6'nın osteojenik etkisiyle OCN gen ifadeleri yüksek bulundu. On ikinci günde beklenildiği gibi kitosan/aljinat grubunda diğer gruplara kıyasla düşük gen ifade seviyeleri gözlemlendi. On ikinci gün OCN gen ifade seviyelerinin kitosan/PLGA ve kompozit yapıda anlamlı olarak yüksek olması baskın olan BMP-6 etkisiyle farklılaşmanın arttığı düşünülebilir. Ek olarak, 4. güne kıyasla 12. günde yine

kitosan/PLGA ve kompozit yapı gruplarında gözlenen OCN gen ifadelerindeki belirgin artış BMP-6'nın farklılaşma üzerindeki etkilerini doğrulamaktadır. RT-PCR sonuçlarına göre Runx2 ve OCN gen ifade seviyelerinin tüm zamanlarda birbiriyle uyumlu olduğu vurgulanmalıdır.

Matris mineralizasyonu analizi için kültürün 8. ve 12. günlerinde von Kossa boyaması yapıldı. Von Kossa analizinin limitasyonları dahilinde tüm gruplarda belirli derecelerde boyanma olmasına rağmen, kitosan/PLGA grubunda ve kompozit yapıda beklenildiği gibi makroskopik olarak belirgin koyu renk boyanmanın olduğu kaydedildi. ECM sentezinin biyomineralizasyon sürecinin önemli bir aşaması olduğu bilindiğinden, bu bulgu SEM görüntülerindeki ECM sentezindeki farklılıklar ile açıklanabilir. Von Kossa boyanmasındaki bu farklılıklar elde edilen RT-PCR sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda hücrelerin morfolojileri, dağılımları ve davranışlarını değerlendirmek için SEM analizinin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla kültürlerin 2, 4 ve 8. günlerinde SEM görüntüleri elde edildi. Ekstraselüler matris (ECM) osteoblastik hücre fonksiyonunun dağılımında önemli bir rol oynamakta ve ECM komponentleri özellikle de tip-1 kollajen sentezi mineralizasyon için gereklilik arz etmektedir (131, 132). SEM bulgularında sadece kitosan iskele kullanılan gruplara göre büyüme ve farklılaşma faktörleri içeren gruplarda 2. günden başlayarak ECM sentezinde, hücre çoğalmasında ve mineralize doku oluşumunda belirgin fark olduğu kaydedildi. Bu bulgunun, kısmen MTT deneylerinde elde edilen hücre sayıları arasındaki farktan kaynaklandığı düşünülebilir. Kompozit yapı içerisine ekilmiş hücrelerde daha fazla ECM sentezi olduğu ve diğer gruplara kıyasla doku iskelesinin gözeneklerinin izlenememesi dikkat çekicidir. Büyüme ve farklılaşma faktörlerinin olmadığı boş kitosan doku iskelesi üzerinde hücrelerin yayılmasının iyi olmadığı izlenirken tam tersine kompozit yapıda sementoblastların boşluklar üzerinde çok iyi derecede tutunup yayıldığı ve yüzeyi neredeyse kapattığı görüldü. Bu veriler ışığında, aljinat mikroküreler, PLGA nanopartikülleri içeren kitosan doku iskelesinden oluşan kompozit

yapının kontrollü salım sistemi olarak işlev gördüğü ve kitosan, kitosan/aljinat ve kitosan/PLGA gruplarına göre hücre fonksiyonları üzerinde daha pozitif bir etki oluşturduğu belirlenmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri, farklılaşma analizlerini desteklemekte ve hem kitosan doku iskelelerinin hücre tutunması ve yayılmasındaki önemini, hem de aljinat mikroküreler ve PLGA nanopartiküllerin doku oluşumunu destekleyici etkilerini işaret etmektedir.

Periodontal rejenerasyon ve doku mühendisliği kapsamında literatürde sementoblastlar üzerindeki araştırma sayısı azdır. Periodontal rejenerasyonda önemli etkileri olabileceği düşünülen IGF-I ve BMP-6'nın sementoblastlar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışma sayısı ise son derece sınırlıdır. Büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrollü ve ardışık salımının sementoblastlar üzerindeki etkisini inceleyen çalışmaya ise literatürde rastlanılmamıştır.

Çalışma grubumuzdan Kutlu ve diğ. (133) sementoblastlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada trombositten zengin plazma emdirilmiş kitosan doku iskelelerinin PDGF, IGF-I ve TGF- $\beta$  salım kinetikleri değerlendirilerek hücreler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre trombositten zengin plazma yüklenen kitosan iskelelerin sementoblast hücrelerinin çoğalmalarını, farklılaşmalarını ve mineralizasyonlarını artırdığı kaydedilmiştir.

Saygın ve diğ. (68)'nin yaptıkları çalışmada IGF-I, PDGF-BB ve TGF- $\beta$ 'nin sementoblastlar üzerine etkileri incelenmiş, IGF-I ile 24 saat muamele edilen hücrelerde OCN ve OPN gen ifade seviyelerinin azaldığı, BSP mRNA ifade seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, sementoblast hücre kültürünün 4. ve 12. günlerinde yapılan gen ifade analizinde, OCN gen ifade seviyelerinin tek başına IGF-I'in salımının sağlandığı kitosan/aljinat grubunda, kitosan/PLGA ve kompozit gruplarına göre incelenen tüm zamanlarda anlamlı olarak daha düşük olduğu kaydedildi. Kaydedilen bu sonuçlar Saygın ve diğ. (68)'nin bulgularıyla uyumlu bulundu.

Huang ve diğ. (79)'nin yapmış oldukları *in vivo* çalışmada ratlarda oluşturulan defektlere BMP-6 uygulanarak yeni kemik ve sement oluşumu incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre BMP-6 uygulanan gruplarda uygulanmayan kontrol grubuna göre artan oranlarda kemik ve sement oluşumu rapor edilmiştir. Çalışmamızda da benzer olarak, BMP-6'nın salımının sağlandığı (tek başına veya IGF-I ile birlikte) kitosan/PLGA ve kompozit yapı gruplarında boş kitosan ve kitosan/aljinat gruplarına göre mineralizasyonun daha belirgin olduğu kaydedildi.

Araştırmamızın sonuçlarını özetlemek gerekirse; çalışmanın ilk kısmında planlanan şekilde kontrollü ve ardışık salımı sağlayabilecek kompozit yapının üretimi gerçekleştirildi. IGF-I'in salımını sağlayacak aljinat mikroküreler üretilip karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Çalışmalar sonucunda IGF-I'in beklenildiği gibi erken dönem salımını sağlayacak karakterizasyonda olduğu belirlendi. Sonraki aşamada, BMP-6'nın salımını sağlayacak PLGA nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirildi. Yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla PLGA nanopartiküllerin BMP-6 için uygun bir taşıyıcı olduğuna karar verildi. Oluşturulan sistemlerin BSA ile öncü salım çalışmaları sonucunda IGF-I ve BMP-6'nın salımı için uygun taşıyıcı sistemler olduğu belirlendi. Sonraki aşamada mikroküreler ve nanopartikülleri taşıyacak doku iskelesi olan kitosanın üretimi ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanarak, grubumuzca önceden yapılan çalışmalarla uygunluğu değerlendirildi. Kompozit yapı üretiminin son basamağında ise mikroküre ve nanopartiküller kitosan doku iskelesi içerisine entegre edilerek sistemin üretimi tamamlandı. Böylelikle doğal sürecin taklit edilmesini sağlayacak yeni ve farklı bir taşıyıcı sistemin oluşturulması planlanan doğrultuda ve başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

Doku iskelelerinin fiziksel ve kimyasal yapılarının kullanılacak hücre fonksiyonları üzerindeki etkisi doku mühendisliği uygulamalarının başarısını belirler. Araştırmamız kapsamında gerçekleştirdiğimiz hücre kültürü (*in vitro*) deneylerinde, doku iskeleleri ile periodontal rejenerasyonda önemli bir rolü olduğu bilinen sementoblast hücreleri kullanıldı. Elde edilen bulgular,

planlanan şekilde kontrollü ve ardışık olarak salınan IGF-I ve BMP-6'nın sementoblastların hücresel fonksiyonlarını desteklemesi açısından uygun olduğunu göstermektedir. Böylece; kitosan, aljinat mikroküre, PLGA nanopartikülleri içeren kompozit yapının uygun fiziksel özellikleriyle ve hem ardışık hem de kontrollü olarak IGF-I ve BMP-6'nın salımını sağlamasıyla doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir doku iskelesi olduğu kabul edilebilir.

Çalışmamızın bulguları periodontal doku mühendisliğinde büyüme ve farklılaşma faktörlerinin eş zamanlı olarak salımının aksine doğal sürece uygun olarak ardışık salımının sağlandığı bir sistemin üretilerek karakterizasyonunun belirlenmesi ve oluşturulan bu yeni sistemin periodontal rejenerasyonda önemi olan sementoblastlar üzerinde araştırılmış olması açısından önemlidir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Elektrospreyleme yöntemi ile üretilen aljinat mikroküreler IGF-I'in kontrollü salımı için uygun özelliklere sahiptir.
2. Emülsiyon-difüzyon-evaporasyon yöntemi ile elde edilen PLGA nanopartiküllerin BMP-6'nın kontrollü salımı için uygun karakterde bir taşıyıcı olduğu kabul edilebilir.
3. Aljinat mikroküreler ve PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelesine entegre edilmesiyle elde edilen kompozit yapı doku mühendisliği için uygun üç boyutlu, ara bağlantılı ve gözenekli yapıya sahiptir.
4. Oluşturulan kompozit yapı ile doğal süreci taklit eder tarzda IGF-I ve BMP-6'nın kontrollü ve ardışık salımı sağlanabilir.
5. Üretilen kompozit yapı periodontal rejenerasyonda önemli role sahip sementoblastların çoğalmalarını, farklılaşmalarını ve mineralize doku oluşturma potansiyellerini artırmaktadır.
6. Elde edilen bu sonuçların periodontal doku mühendisliği kapsamında uygunluğunun desteklenerek doğrulanabilmesi için yapılacak hayvan deneyleri ve sonrasında klinik çalışmalar çok değer taşıyacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Nanci, A., Bosshardt, D.D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40, 11-28.
2. Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366 (9499), 1809-20.
3. Nishimura, F., Iwamoto, Y., Soga, Y. (2007). The periodontal host response with diabetes. *Periodontology 2000*, 43, 245-53.
4. Southerland, J.H., Taylor, G.W., Moss, K., Beck, J.D., Offenbacher, S. (2006). Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology 2000*, 40, 130-43.
5. Aichelmann - Reidy, M.E., Reynolds, M.A. (2008). Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *Journal of Periodontology*, 79, 387-93.
6. Elangovan, S.S., Srinivasan, S., Ayilavarapu, S. (2009). Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9, 399-410.
7. Wang, H.L., MacNeil, R.L. (1998). Guided tissue regeneration. Absorbable barriers. *Dental Clinics of North America*, 42, 505-22.
8. Bunyaratavej, P., Wang, H.L. (2001). Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology*, 72, 215-29.
9. Reddy, M.S. (1995). Regenerating periodontal support: a comparison of today's procedures. *The Journal of the American Dental Association*, 126, 583-91.
10. Becker, W., Becker, B.E. (1993). Periodontal regeneration updated. *The Journal of the American Dental Association*, 124, 37-43.

11. Ivanovski, S., Gronthos, S., Shi, S., Bartold, P.M. (2006). Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases*, 12, 358-63.
12. McCulloch, C.A. (1993). Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology 2000*, 1, 16-25.
13. Weng, Y., Wang, M., Liu, W., Hu, X., Chai, G., Yan, Q. ve diğeri. (2006). Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone. *Tissue Engineering*, 12, 1503-13.
14. Akman, A.C. (2007). ***Periodontal doku mühendisliği uygulamaları için kitosan temelli doku iskelelerinin üretilmesi, kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), deksametazon (DEX) salım kinetiklerinin ve in vitro etkinliklerinin tayini***, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
15. Novak, J.M. (2002). Classification of the disease and the conditions affecting the periodontium Newman, M.G., Takei HH, Carranza FA. *Clinical Periodontology* (67) 9th (Ed.) USA: W.B. Saunders.
16. Spector, M. (1998). Basic principles of tissue engineering. In: Lynch Segrjmre (Ed.) *Tissue Engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics* (3-16). USA: Quintessence Publishing.
17. Wang, H.L., Greenwell, H., Fiorellini, J., Giannobile, W., Offenbacher, S., Salkin, L., Townsend, C., Sheridan, P., Genco, R.J. (2005) Periodontal Regeneration. *Journal of Periodontology*, 76, 1601-1622.
18. Lynch, S.E. (1999). Introduction. In: Lynch, S.E., Genco, R.J., Marx, R.E. (Ed.) *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics* (xi–xviii). Chicago: Quintessence Publishing.
19. Taba M. Jr., Jin, Q. (2005) Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 8, 292-302.
20. Vacanti, C.A., Vacanti, J.P. (2000). The science of tissue engineering. *Orthopedics Clinics of North America*, 3, 351-6.

21. Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 22, 589-601.
22. Salgado, A.J., Coutinho, O., Reis, R.L. (2004). Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-65.
23. Heng, B.C., Cao, T., Stanton, L.W., Robson, P., Olsen, B. (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *Journal of Bone Mineral Research*, 19, 1379-94.
24. Meyer, U., Joos, U., Wiesmann, H.P. (2004). Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering Part 1. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 33, 325-32.
25. Mauney, J.R., Blumberg, J., Pirun, M., Volloch, V., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L. (2004). Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Engineering*, 10, 81-92.
26. Sakata, Y., Ueno, T., Kagawa, T., Kanou, M., Fujii, T., Yamachika, E., Sugahara, T. (2006). Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells - a pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, 34, 461-5.
27. Hutmacher, D.W., Sittinger, M. (2003). Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Engineering*, 9, 45-64.
28. Emans, P.J., Surtel, D.A., Frings, E.J., Bulstra, S.K., Kuijjer, R. (2005). In vivo generation of cartilage from periosteum. *Tissue Engineering*, 11, 369-77.
29. Owen, M. (1970). The origin of bone cells. *International Review of Cytology*, 28, 213-38.

30. Bartold, P.M., Narayanan, A.S., Schwartz, Z., Dean, D.D., Boyan, B.D. (1996). Biology and physiology of the periodontium. Kornman, K.S. (Ed.) *Fundamentals of Periodontics* (61-107). Chicago: Quintessence Publishing.
31. Akay, M.T. (2001). Genel Histoloji. In : Akay, M.T. (Ed.) *Kemik Dokusu 5th edition* (126-49). Ankara: Palme Yayıncılık.
32. Bancroft, J.D., Stevens, A. (1996). Bone. In: *Theory and Practice of Histological Techniques. 4th edition* (309-39). New York: Churchill Livingstone.
33. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2003). *Basic Histology 10th edition* (144-6). New York: McGrawhill.
34. AAP Academy report (2005). Periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*, 76, 1601-22.
35. MacNeil, R.L., Somerman, M.J. (1999). Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology 2000*, 19, 8-20.
36. Isaka, J., Ohazama, A., Kobayashi, M., Nagashima, C., Takiguchi, T., Kawasaki, H., Tachikawa, T., Hasegawa, K. (2001). Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *Journal of Periodontology*, 72, 314-23.
37. Phipps, R.P., Borello, M.A., Blieden, T.M. (1997). Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *Journal of Periodontal Research*, 32, 159-65.
38. Giannopoulou, C., Cimasoni, G. (1996). Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 75, 895-902.

39. Shimono, M., Ishikawa, T., Matsuzaki, H., Matsuzaki, H., Hashimoto, S., Muramatsu, T. ve diğ. (2003). Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microscopy Research and Technique*, 60, 491-502.
40. Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahimi, J. ve diğ. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364,149-55.
41. Wolf, M., Lossdörfer, S., Abuduwali, N., Meyer, R., Kebir, S., Götz, W., Jäger, A. (2013). In vivo differentiation of human periodontal ligament cells leads to formation of dental hard tissue. *Journal of Orofacial Orthopedics*, 74, 494-505.
42. Ten Cate, A.R. (2003). In: *The Periodontium: Oral Histology:Development, Structure and Function*. (276-79). St. Louis: Mosby
43. D' Errico, J.A., MacNeil, R.L., Takata, T., Berry, J., Strayhorn, C., Somerman, M.J. (1997). Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. *Bone*, 20, 117-26.
44. Bosshardt, D.D. (2005). Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *Journal of Dental Research*, 84, 390-406.
45. Carranza, F.A., Bernard, G.W. (2002). The tooth supporting structures In: Newman, M.G., Takei, H.H., Carranza, F.A. *Clinical Periodontology 9th edition* (42). USA: W.B. Saunders.
46. Birkedal-Hansen, H., Butler, W.T., Taylor, R.E. (1977). Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of the bovine dental cementum. *Calcified Tissue Research*, 23, 39-44.

47. Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E. Shiga, A. (1986). Synthesis of cementum-like tissues in vitro by cells cultured from bone: A light and electron microscope study. *Journal of Periodontal Research*, 21, 592-612.
48. Jin, Q., Zhao, M., Webb, S.A., Berry, J.E., Somerman, M.J., Giannobile, W.V. (2003). Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 54-60.
49. Zhao, M., Jin, Q., Berry, J.E., Nociti, F.H. Jr., Giannobile, W.V., Somerman, M.J. (2004). Cementoblast delivery for tissue engineering. *Journal of Periodontology*, 75, 154-61.
50. Anusakthien, O., Giannobile, W.V. (2002) Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3,129-39.
51. Lee, S.J. (2000). Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Medical Journal*, 4, 704-19.
52. Lee, J.E., Kim, S.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Cho, H., Lee, S.H. ve diğ. (2004). Effects of a chitosan scaffold containing TGF- $\beta$ 1 encapsulated chitosan microspheres on in-vitro chondrocyte culture. *Artificial Organs*, 28, 829-39.
53. Ripamonti, U., Reddi, A. (1997). Tissue engineering, morphogenesis and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 8, 154-63.
54. Shimono, M., Ishikawa, H., Matsuzaki, H., Hashimoto, S., Muramatsu, T. (2003). Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microscopy Research and Technique*, 60, 491-502.
55. Wikesjö, U.M., Selvig, K.A. (1999). Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology 2000*, 19, 1-172.

56. Cross, F., Roberts, J., Weintraub, H. (1989). Simple and complex cell cycles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 5, 341-96.
57. Raff, M.C. (1996). Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell*, 86, 173-75.
58. Güneş, H. (1999). Sitokinlerin hücre döngüsü üzerindeki etkileri. *Turkish Journal of Biology*, 23, 283-92.
59. Oringer, R.J. (2002). Biological mediators for periodontal and bone regeneration. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 23, 501-12.
60. Position paper. (1996). The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*, 67, 545-53.
61. Mohan, S., Baylink, D.J. (1991). Bone growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 263, 30-48.
62. Lee, J., Stavropoulos, A., Susin, C., Wikesjö, U. (2010). Periodontal Rejuvenation: Focus on growth and differentiation factors. *Dental Clinics of North America*, 54, 93-111.
63. McCarthy, T.I., Centrella, M. (1989). Regulatory effects of insulin-like growth factor-1 and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology*, 124, 309-1.
64. Dereka, X.E., Markopoulou, C.E., Vrotsos, I.A. (2006). Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors*, 24, 260-7.
65. Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydziel, S., Varghese, S. (1993). Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology*, 133, 33-8.
66. Palioto, D., Coletta, R., Graner, E., Joly, J., Martorelli De Lima, A. (2004). The influence of enamel matrix derivate associated with

- insulin-like growth factor-I on periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 75, 498-504.
67. Hsu, C., Chang, J. (2004). Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *Journal of Hand Surgery (American volume)*, 29, 551-63.
  68. Saygin, N.E., Tokiyasu, Y., Giannobile, W.V., Somerman, M.J. (2000). Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *Journal of Periodontology*, 71, 1591-600.
  69. Matsuda, N., Lin, W.L., Kumar, N.M., Cho, M.I., Genc, R.J. (1992). Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *Journal of Periodontology*, 63, 515-25.
  70. Kreuse-Deutman, H., Ruhe, Q., Spauwen, P.H., Jansen, J.A. (2005). Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. *Biomaterials*, 26, 1131-8.
  71. Carreira, A.C., Alves, G.G., Zambuzzi, W.F., Sogayar, M.C., Granjeiro, J.M. (2014). Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1, 561C, 64-73.
  72. Rao, S.M., Ugale, G.M., Warad, S.B. (2013). Bone morphogenetic proteins: periodontal regeneration. *North American Journal of Medical Sciences*, 5, 161-8.
  73. Park, B.W., Hah, Y.S., Kim, D.R., Kim, J.R., Byun, J.H. (2007). Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Archives of Oral Biology*, 52, 983-89.
  74. Saygin, N.E., Giannobile, W.V. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 24, 73-98.



75. Ripamonti, U., Heliotis, M., Rueger, D.C., Sampath, T.K. (1996). Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic-1 in the baboon. *Archives of Oral Biology*, 41, 121-26.
76. Boden, S.D., Hair, G., Titus, L., Racine, M., McCuaig, K., Wozney, J.M., Nanes, M.S. (1997). Glucocorticoid- induced differentiation of fetal rat calvarian osteoblasts is mediated by bone morphogenetic protein-6. *Endocrinology*, 138, 2820-8.
77. Hughes, F.J., Collyer ,J., Stanfield ,M., Goodman, S.A. (1995). The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology*, 136, 2671-7.
78. Gitelman, S.E., Kirk, M., Ye, J.Q., Filvaroff, E.H., Kahn, A.J., Derynck, R. (1995). Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. *Cell Growth and Differentiation* 6, 827.
79. Huang, K.K., Shen, C., Chiang, C.Y., Hsieh, Y.D., Fu, E. (2005). Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in fenestration defect of rats. *Journal of Periodontal Research*, 40, 1-10.
80. Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüřderelioǧlu, M., Nohutcu, R.M. (2010). Bone morphogenetic protein-6 loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells. *Artificial Organs*, 34, 65-74.
81. Nakahara, T., Nakamura, T., Kobayashi, E., Kuremoto, K., Matsuno, T. (2004). In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament–derived cells. *Tissue Engineering*, 10, 537-44.
82. Meyer, U., Joos, U., Wiesmann, H.P. (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering Part 2. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 33, 523-30.

83. Meyer, U., Joos, U., Wiesmann, H.P. (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering Part 3. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 33, 635-41.
84. Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., Petite, H. (2005). Engineering bone: Challenges and obstacles. *Journal of Cellular Molecular Medicine*, 9, 72-84.
85. Di Martino, A., Sitterling, M., Risbud, M.V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer of orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983-90.
86. Senel, S., McClure, S.J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1467-80.
87. Muzarelli, R.A., Baldassarre, V., Conti, F., Ferrara, P., Biagini, G., Gazzanelli, G., Vasi, V. (1988). Biological activity of chitosan: Ultrastructural study. *Biomaterials*, 9, 247-52.
88. Lahiji, A., Sohrabi, A., HUngerford, D.S., Frondoza, C.G. (2000). Chitosan supports the expression of the extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal of Biomedical Material Research*, 51, 586-95.
89. İkinci, G., Senel, S., Akıncıbay, H., Kaş, S., Erciş, S., Wilson, C.G., Hincal, A.A. (2002). Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 235, 121-7.
90. Singla, A.K., Chawla, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 53, 1047-67.

91. Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., Kim, C.Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 553-7.
92. Chandy, T., Sharma, C.P. (1993). Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials*, 14, 939-44.
93. Klokkevold, P.R., Vandemark, L., Kenney, E.B., Bernard, G.W. (1996). Osteogenesis enhanced by chitosan (Poly-N-Acetylglucosaminoglycan) in vitro. *Journal of Periodontology*, 67, 1170-5.
94. Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüřderelioǧlu, M., Nohutcu, R.M. (2010). bFGF-loaded HA-chitosan; a promising scaffold for periodontal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92, 953-62.
95. Yılgör, P., Tuzlakoǧlu, K., Reis, R.L., Hasırcı, N., Hasırcı, V. (2009). Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 30, 3551-9.
96. Chen, F.M., Chen, R., Wang, X., Sun, H., Wu, Z. (2009). In vitro cellular responses to scaffolds containing two microencapsulated growth factors. *Biomaterials*, 30, 5215-24.
97. Lynch, S.E., de Castilla, G.R., Williams, R.C., Kiritsy, C.P., Howell, T.H., Reddy, M.S. (1991). The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology*, 62, 458-67.
98. Howell, T.H., Fiorellini, J.P., Paquette, D.W., Offenbacher, S., Giannobile, W.V., Lynch, S.E. (1997). A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in

- patients with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 68, 1186-93.
99. Soran, Z., Aydın T. R. S., Gümüşderelioğlu, M. (2012). Chitosan scaffolds with BMP-6 loaded alginate microspheres for periodontal tissue engineering, *Journal of Microencapsulation*, 29, 770-780.
  100. Sill, T.J., Von Recum, H.A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 1989-2006.
  101. Mittal G., Sahana, D.K., Bhardwaj, V., Kumar, M.N.V.R. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo, *Journal of Controlled Release*, 119, 77–85.
  102. Tığlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M. (2007). In vitro characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674.
  103. Ribeiro, C.C., Barrias, C.C., Barbosa, M.A. (2004). Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials*, 25, 4363-4373.
  104. atıker, E., Gümüşderelioğlu, M., Güner. A. (2000). Degradation of PLA, PLGA homo- and copolymers in the presence of serum albumin: a spectroscopic investigation. *Polymer International*, 49, 728-734.
  105. Tığlı, R.S. (2009). **Kıkırdak Doku Rejenerasyonunda Kitosan Doku iskelesi Destekli Biyoreaktör Performansının İncelenmesi**, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
  106. Bartold, P.M., Xiao, L., Lyngstaadas, S.P., Paine, M.L., Snead, M.L. (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 41, 123-35.

107. Kim, S., Kang, Y., Krueger, C.A., Sen, M., Holcomb, J.B., Chen, D. (2012). Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. *Acta Biomaterialia*, 8, 1768-77.
108. Raiche, A.T., Puleo, D.A. (2004). In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials*, 25, 677-85.
109. Wikesjo, U., Xiropaidis, A., Thomson, R., Cook, A., Selvig, K., Hardwick, W. (2003). Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 705-714.
110. Giannobile, W., Ryan, S., Shih, M., Su, D., Kaplan, P., Chan, T. (1998). Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *Journal of Periodontology*, 69, 129.
111. Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Imamura, T. (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of Cell Science*, 112, 3519-27.
112. Kührtreiber, W.M., Lanza, P., Chick, W.L. (1999). Treating Disease Using Implanted Living Cells in Microspheres. *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics* (29-39). Boston: Birkhäuser.
113. Wan, L.S.C., Heng, P.W.S., Chan, L.W. (1990). Development of alginate microcapsules by emulsification. In: *Proceedings of the NUS-JSPS Seminar on Recent Developments in Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Japan, Chiba University)*, 243–255.
114. Salib, N.N., El-Menshawy, M.A., Ismail, A.A. (1978). Utilization of sodium alginate in drug microencapsulation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 1230–34.

115. Li, B.-Z., Wang, L.-J., Li, D., Bhandari, B., Li, S.-J., Lan, Y., Chen, X. D., Mao, Z.-H. (2009). Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *Journal of Food Engineering*, 92, 250-4.
116. Berklund, C., Kim, K., Pack, D. W. (2001). Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. *Journal of Controlled Release*, 73, 59-74.
117. Panyam, J., Zhou, W.Z., Prabha, S., Sahoo, S.K., Labhasetwar, V. (2002). Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb Journal*. 16, 1217-26.
118. Silva, G.A., Ducheyne, P., Reis, R.L. (2007). Materials in particulate form for tissue engineering.1. Basic concepts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 4-24.
119. Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T.M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125, 193-209.
120. Hariharan, S., Bhardwaj, V., Bala, I., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Ravi Kumar, M.N. (2006). Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharmaceutical Research*, 23, 184-95.
121. Mirdailami, O., Khoshayand, M.R., Soleimani, M., Dinarvand, R., Atyabi, F. (2014). Release optimization of epidermal growth factor from PLGA microparticles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 19, 539–547.
122. Rawat, A., Burgess, D.J. (2011). USP apparatus 4 method for in vitro release testing of protein loaded microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 409, 178-184.

123. Jaklenec, A., Wan, E., Murray, M. E., Mathiowitz, E. (2008). Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 185-192.
124. Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 471–476.
125. Khor, E., Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339-49.
126. Freyman, T.M., Yannas, I.V., Pek, Y.S., Yokoo, R., Gibson, L.J. (2001). Micromechanics of fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Experimental Cell Research*, 269, 140-53.
127. Arpornmaeklong, P., Suwatwirote, N., Pripatnanont, P., Oungbho, K. (2007). Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 36, 328-37.
128. Kutlu, C., Cakmak, A.S., Gümüşderelioğlu, M. (2014). Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: in vitro study. *Journal of Microencapsulation*, 31, 700-7.
129. Tan, H., Wu, J., Lao, L., Gao, C. (2009). Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5, 328-337.
130. Liu, H., Fan, H., Cui, Y., Chen, Y., Yao, K., Goh, J.C. (2007). Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan-gelatin scaffold. *Biomacromolecules*, 8, 1446-55.

131. Franceschi, R.T. (1999). The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 10, 40-57.
132. Ott, S.M. (2002). Histomorphometric analysis of bone remodelling. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rohan GA (ed.) *Principles of Bone Biology 2nd edition* (303-20). San Diego: Academic Press.
133. Kutlu, H.B. (2011). ***Trombositten zengin plazma emdirilmiş kitosan temelli taşıyıcıdan PDGF, TGF- $\beta$  ve IGF-I büyüme faktörlerinin salım kinetiklerinin saptanması ve kitosan taşıyıcı jel ile uygulanan trombositten zengin plazmanın periodontal ligament hücreleri ve sementoblastlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi: in-vitro***. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.