

**SIÇANDA ALVEOLER DEFEKT MODELİNDE ÇİFT  
KATMANLI POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT)/TCP  
BİYOMALZEMESİNİN KEMİK İYİLEŞMESİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**THE INVESTIGATION OF EFFECT OF DOUBLE LAYER  
POLY (GLYCEROL-SEBACAT) /TCP BIOMATERIAL ON  
BONE HEALING IN RAT ALVEOLAR DEFECT MODEL**

**TUĞÇE AKYÜZ**

**PROF. DR. İBRAHİM VARGEL**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

## ÖZET

### SIÇANDA ALVEOLER DEFEKT MODELİNDE ÇİFT KATMANLI POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT)/TCP BİYOMALZEMESİNİN KEMİK İYİLEŞMESİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Tuğçe AKYÜZ**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim VARGEL**

**Ekim 2020, 59 sayfa**

FYL-2019-17747 proje nolu bu çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada, elastomer yapılı poli(gliserol-sebakat) polimeri ile kombine edilmiş trikalsiyum fosfat seramiğinin alveoler defekte etkisini inceledik. Doku iskelemiz Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarı'nda geliştirildi. Geliştirilen bu doku iskelesinin, alveolar kemik defekti onarımında altın standart olarak kabul edilen otogreft ile karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmamızda, ağırlığı 300-350 gr olan 30 tane erkek Wistar-albino sıçanlar kullanılmıştır. Grup farketmeksizin her bir sıçanın alveoler bölgesinde kritik boyutlu (7x4x3 mm) defektler oluşturulmuştur. Her birinde 10 deney hayvanı kullanılan ve toplam 3 gruba ayrılan denekler (3 grup; n=30) 6 aylık süre sonrasında incelenmiştir. Kontrol grubu (defekt) olarak oluşturulan gruptaki deneklere sadece kemik defekti oluşturulup tedavi edici başka bir uygulama yapılmamıştır. Otogreft grubu olarak belirlenen grupta deneklerin iliyak bölgesinden alınan otogreft hasarlı bölgeye implante edilmiştir. Üçüncü grubumuzda ise deneklerin defekt oluşturulmuş alveolar bölge PGS/TCP biyomalzemesi ile rekonstrükte edilmiştir. 6. ayın sonunda kurban edilen sıçanların defekt bölgelerinden alınan örnekler radyolojik ve histolojik olarak incelenmiştir. Verilerin istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Analizler sonucunda en iyi kemikleşme oranı en fazla otogreft grubunda gözlemlendi. Doku iskelesi olarak geliştirilen ve bu tez çalışmasının ana basamağını oluşturan PGS/TCP

biyomalzeme grubunun ise kemik iyileşmesinde otogreftte yakın ancak defekt grubundan daha iyi olumlu etkisinin olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Alveolar Kemik defekti, kritik boyutta alveolar defekt, doku iskelesi, otogreft, trikalsiyum fosfat, poli (gliserol-sebakat).

## **ABSTRACT**

### **THE INVESTIGATION OF EFFECT OF DOUBLE LAYER POLY (GLYCEROL-SEBACAT) /TCP BIOMATERIAL ON BONE HEALING IN RAT ALVEOLAR DEFECT MODEL**

**Tuğçe AKYÜZ**

**Master of Science, Bioengineering Division**

**Supervisor: Prof. Dr. İbrahim VARGEL**

**October 2020, 59 pages**

This study with project number FYL-2019-17747 was supported by Hacettepe University BAP Coordination Unit. In this study, we investigated the effect of tricalcium phosphate ceramic combined with elastomeric poly (glycerol-sebacate) polymer in alveolar defect. Our tissue scaffolding was developed in the laboratory of the Bioengineering Department of Hacettepe University. It was aimed to compared this developed tissue scaffold with the autograft which is accepted as the gold standard in alveolar bone defect repair. In our study, 30 male Wistar-albino rats weighing 300-350 gr were used. Regardless of the group, critical sized (7x4x3 mm) defects were created in the alveolar region of each rat. Subjects, each of which used 10 experimental animals and divided into 3 groups in total (3 groups; n=30) were examined after 6 months. Only the bone defect was created and no therapeutic application was applied to the subjects in the group formed as the control group (defect). In the group determined as the autograft group, the autograft taken from iliac region of the subjects was implanted into the damaged area. In our third group, PGS/TCP biomaterial was reconstructed in the defected alveolar region of the subjects. Samples taken from the defect regions of the rats sacrificed at the end of the 6<sup>th</sup> month were examined radiologically and histologically. Statistical analysis of the data was done.

As a result of the analyzes, ossification rate was observed mostly in the autograft group. PGS/TCP group, which was developed as a tissue scaffold and constitutes the main step of this thesis, has a positive effect on bone healing.

**Keywords:** Bone defect, critical sized defect, tissue scaffold, autograft, tricalcium phosphate, poly (glycerol-sebacate).

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, çalışma azmini ve yol göstericiliğini hayatım boyunca örnek alacağım değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. İbrahim VARGEL'e,

Çalışmamda kullandığım PGS/ $\beta$ -TCP kompozitlerinin üretimini gerçekleştiren değerli hocam Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a ve BMT Calsis ekibine,

Çalışmanın histomorfometrik analizini gerçekleştiren Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'a,

Çalışmanın mikrotomografi analizini gerçekleştiren Dr. Öğr. Üyesi Mert OCAK'a,

Çalışmanın istatistiksel analizini gerçekleştiren Dr. Esra KUTSAL KAYNAR'a,

Yüksel lisans eğitimim boyunca benimle bilgi ve tecrübesini paylaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Mehmet Emin YÜKSEL'e

Çalışmamın cerrahi uygulamasının yapılmasında yardımını esirgemeyen Dr. Arda KÜÇÜKGÜVEN'e,

Çalışmamın histoloji kısmında desteğini ve yardımını esirgemeyen Dr. Sefa Burak ÇAM'a,

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Birimine,

Yardım ve desteklerini esirgemeyen Selcen MOLLAYAKUPOĞLU'na, Gülçin GÜNAL'a,

Hayatta bana verilen en büyük şansım olan ve bugünlere gelmem için her türlü desteği bana sağlayan, yorulduğumda ayağa kaldıran, sevgi ve sabrıyla güç veren, ilk öğretmenim canım anneme ve aileme,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Alveoler Yarık .....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etyoloji.....	3
2.1.3. Embriyoloji .....	3
2.1.4. Sınıflandırma.....	4
2.1.5. Tedavi Yöntemleri .....	6
2.2. Kemik Greftleri.....	7
2.2.1. Otojen Kemik Greftleri .....	8
2.2.2. Allojen Kemik Greftleri .....	9
2.2.3. Ksenojen Kemik Greftleri .....	10
2.2.4. Alloplastik Kemik Greftleri .....	10
2.3. Kemik Doku .....	10
2.3.1. Kemik Doku Tipleri.....	11
2.3.1.1. Kompakt Kemik (Kortikal Kemik-Lameller Kemik).....	11
2.3.1.2. Kansellöz Kemik (Trabeküler Kemik-Süngerimsi Kemik).....	12
2.3.2. Kemik Doku Matriksi .....	13

2.3.3. Kemik Doku Hücreleri .....	14
2.3.4. Kemik Oluşumu (Osteogenezis-Ossifikasyon) .....	15
2.3.4. Kemik İyileşmesi.....	16
2.3.4.1. Primer Kemik İyileşmesi (Doğrudan-Direkt İyileşme) .....	16
2.3.5. Kemik Belirteçleri .....	18
2.3.5.1. Kemik Yapım Belirteçleri.....	19
2.3.5.2. Kemik Yıkım Belirteçleri .....	20
2.4. Doku Mühendisliği.....	20
2.5. Kemik Doku Mühendisliği.....	22
2.5.1. Tri-Kalsiyum Fosfat (TCP) .....	24
2.5.2. Poli (Gliserol-Sebakat) .....	26
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>28</b>
3.1. Protokol Dizaynı .....	28
3.2. Deney Hayvanları.....	28
3.3. Preoperatif Hazırlık ve Anestezi .....	28
3.4. Çalışmada Kullanılan Materyaller .....	29
3.4.1. Çift Katmanlı Poli (gliserol-sebakat)/TCP Doku İskelesinin Hazırlanması..	29
3.5. Çalışma Grupları .....	31
3.6. Cerrahi İşlem.....	32
3.7. Post Operatif Evre .....	35
3.8. Radyomorfometrik Çalışmalar .....	35
3.9. Histomorfometrik Çalışmalar.....	35
3.10. İstatistiksel Çalışmalar .....	36
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
4.1. Radyomorfometrik Değerlendirme .....	37
4.2. Histomorfometrik Değerlendirme .....	38

<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>41</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>46</b>
<b>EK-1 HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI.....</b>	<b>55</b>
<b>EK-2 HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI.....</b>	<b>56</b>
<b>EK-3 DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI.....</b>	<b>57</b>
<b>ORJİNALLİK RAPORU .....</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>59</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Grupların istatistiksel ortalama ve standart sapma değerleri.....	39
---	----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Kernahan ve Stark sınıflandırması .....	5
<b>Şekil 2.2.</b>	Veau sınıflandırması .....	6
<b>Şekil 2.3.</b>	Kemik dokusunun hiyerarşik yapısı .....	12
<b>Şekil 2.4.</b>	Kemik doku hücreleri ( <a href="https://glidewell dental.com/education/chairside-dental-magazine/volume-12-issue-3/bone-substitutes">https://glidewell dental.com/education/chairside-dental-magazine/volume-12-issue-3/bone-substitutes</a> .....	15
<b>Şekil 2.5.</b>	Kemik iyileşmesinin evreleri I) Hematom evresi; Kırık meydana geldikten sonra kemiğin defekt alanında kanama sonucu hematoma oluşur. ....	18
<b>Şekil 2.6.</b>	Doku Mühendisliği Yaklaşımı .....	22
<b>Şekil 2.7.</b>	PGS elastomeri sentezi .....	27
<b>Şekil 3.1.</b>	Hazırlanan çift katmanlı yapının şematik gösterimi.....	30
<b>Şekil 3.2.</b>	PGS/TCP materyalinin üretim şeması .....	31
<b>Şekil 3.3.</b>	7x4x3 mm'lik PGS/ $\beta$ -TCP biyomateryalinin optik fotoğrafı.....	31
<b>Şekil 3.4.</b>	A) Üst çenede defekt oluşturulan alveol bölgesi. B) Defekt oluşturulan damağın alveoler bölgesine yerleştirilen otogreftin alındığı iliak kemik bölgesi. ....	33
<b>Şekil 3.5.</b>	C) Alveoler kemikten alınan 7x4x3 mm'lik kemik defekti. D) Defekt bölgesine yerleştirilecek kemik otogrefti. ....	33
<b>Şekil 3.6.</b>	E) Defekt bölgesine yerleştirilen PGS/TCP biyomalzemesi. ....	34
<b>Şekil 3.7.</b>	F) Defekt bölgesine yerleştirilen otogreft. ....	34
<b>Şekil 4.1.</b>	A) Defekt grubuna ait tomografik radyograf. B) PGS/ $\beta$ -TCP doku iskelesinin bulunduğu gruba ait tomografik radyograf. C) Otogreft grubuna ait tomografik radyograf.....	37
<b>Şekil 4.2.</b>	Mikrotomografide hesaplanan kemik hacmi / total defekt hacmi ölçümlerine ait tanımsal istatistikler, ortalama ve standart sapma olarak hata çubukları grafiğinde gösterilmiştir. ....	38

- Şekil 4.3.** Histomorfometrik olarak hesaplanan defekt alanındaki yeni kemik yüzdesi ölçümlerine ait tanımsal istatistikler, ortalama ve standart sapma olarak hata çubukları grafiğinde gösterilmiştir..... 39
- Şekil 4.4.** Sol kolonda küçük ve sağ kolonda büyük büyütmede negatif kontrol (A, D), pozitif kontrol (C, F) grupları ile implant uygulanan (B, E) gruplara ait alveoler defekt görüntüleri görülmektedir. Tüm örneklerde defekt alanında vaskülarize, kollagen liflerden zengin bağ dokusu (BD) ve eşlik eden yeni kemik spikülleri (K) izlenmektedir. D-F’de olgun kemik kırmızı, yeni kemik yeşil renkte görülmektedir. A-C: Hematoksilen Eozin x12,5. D-F: Gomori Trikrom x100. .... 40

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	: Alkalen Fosfataz
BMP	: Kemik Morfojenik Proteini
BSP	: Kemik Siyaloprotein
CNX	: Kollajen Karboksiterminal Crosslinked Telopektid
ECM	: Hücre dışı Matriks
HA	: Hidroksi Apatit
IL-1	: İnterlökin-1
MPa	: Megapaskal
NTX	: Kollajen Aminoterminal Crosslinked Telopektid
OC	: Osteokalsin
PCL	: Polikaprolakton
PCNIP	: Prokollajen Karboksiterminal Propektid
PEG	: Polietilen Glikol
PGS	: Poli (gliserol-sebakat)
PGA	: Poligliserik Asit
PHBV	: Poli(3-hidroksibütirik asit-ko-3-hidroksivalerik asit)
PINP	: Prokollajen Aminoterminal Propektid
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Polilaktik-ko-glikolik asit
PPF	: Polipropilen
TCP	: Trikalsiyum Fosfat
TGF- $\beta$	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta
TME	: Temporomandibuler Eklem
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
316-L	: Paslanmaz Çelik

# 1. GİRİŞ

Dudak/damak yarıkları, üst çene kemiği ve ağız tavanını oluşturacak yumuşak doku ile kemik doku öncülleri olan sağ ve sol palatal rafların ortada birleşmemesinden meydana gelmektedir [1]. Konjenital bozuklukların %65'ini oluşturmaktadır. Ülkemizde yaklaşık görülme sıklığı 1000 canlı doğumda 1'dir [2]. Defekt, embriyonik gelişimin 4. ve 8. haftaları arasında, yüz yapılarının oluşumu esnasında gerçekleşmektedir [3]. Yarık sebepleri olarak glikozaminglikan hyaluronan yokluğu, epitel artıklarının birleşme yerlerinde birikmesi ve palatal rafların orta hatta yönelememesi ve ayırık kalması örnek gösterilebilmektedir [4].

Alveoler kemik defektinin onarımı komplet damak yarıklarının onarımında mutlak yapılması gereken işlemlerdendir. Aksi halde üst çene devamlılığı olmayacağı gibi arka bozukluk ve diş diziliminde bozukluk diş eksiklikleri kaçınılmaz olacaktır. Sonuçta damak yarığı onarımı tamamlanmamış olacaktır. Günümüzde damak yarıklarının onarımı sırasında veya sonrasında var olan alveoler defektin kemik otogreft ile doldurulması, sağlıklı mukoperiosteal flepler ile kapatılıp (uygun osteojenik aktiviteyi taşıyan dokular ile) kemik köprüsü oluşumunun sağlanması (palatoplasti) altın standarttır. Donör sahası olarak genellikle iliyak kemik tercih edilir. Alveoler kemik defekti onarımında iliyak kemik greftinin, alıcı sahaya yerleştirilmesiyle birlikte donör sahada gelişen morbidite (ağrı, skar, uzamış anestezi süresi, enfeksiyon riski, greft yetersizliği, kanama-hematom gibi birtakım olumsuzluklar) faktörleri kemik doku mühendisliği ile kemik otogrefti alternatiflerine yönelmesine yol açmıştır [5]. Doku mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte biyolojik kökenli otojen kemik greftlerinin yerine giderek biyomalzemeler de araştırılmakta ve sorgulanmaktadır [6, 7].

Kritik defekt boyutu, araştırmacılar tarafından farklı şekillerde yorumlanmaktadır. Hollinger ve Schmitz kritik defekt tanımını, canlının hayatı boyunca sahip olduğu iyileşemeyecek durumda olan kemik yokluğu olarak tanımlamıştır [8]. Cooper ve ark. tarafından yapılan kritik boyutlu defekt tanımı ise belirli bir süre tedavi edilmediğinde kendiliğinden iyileşemeyen kemik hasarı olarak tanımlanmaktadır [9].

Kemik doku mühendisliğinde seramik grubunda bulunan, trabeküler kemiğin formunda olan ve osteokondüktif özellik gösteren trikalsiyum fosfatın (TCP), kemik doku üzerindeki etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır [10].

Yine ilk olarak 2002 yılında yumuşak doku mühendisliği için sentezlenen poli(gliserol-sebakat) (PGS), kalp kası, retina ve sinir doku çalışmalarında da sıklıkla tercih edilen bir polimer olmuştur. Kemik dokusu içinde biyouyumlu özellik gösteren PGS, aynı zamanda biyobozunur termoset bir elastomerdir [11].

Bu çalışmada, alveoler kemik defektlerinin tedavi yönteminde genel olarak kabul görmüş ve altın standart olarak nitelendirilmiş otogreft ile Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü tarafından geliştirilen yeni bir doku iskelesinin kemik defekti onarımındaki etkisi karşılaştırılmıştır. Geliştirilen doku iskelesini oluşturan PGS ve TCP materyallerinin osteokondüktif, biyouyumlu, biyobozunur özelliklerinden yararlanılarak oluşturulacak yarık damaklı sıçanlarda bu malzemenin kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Söz konusu doku iskelesinin kemik doku rejenerasyon kabiliyeti radyolojik ve histolojik çalışmalarla incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Alveoler Yarık

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Dudak-damak yarıkları, baş ve boyun bölgesinde sıklıkla görülen konjenital malformasyonlar arasındadır. Yarık dudak-damak insidansı etnik köken ve coğrafi bölge ile değişmekle birlikte izole yarık damak, doğumların binde 0,5'inde görülmüştür [12]. Bu oran Japon halkında binde 2,1; Çin toplumunda binde 1,7 olarak kaydedilmiştir [13]. Avrupa toplumlarında bin canlı doğumda 1,6 ile 2 arasında olup, Afrikalı toplumlarda ise bin canlıda 0,4 oranındadır [14]. Yarık dudak/damak hastalarının % 35'inde ek olarak başka malformasyonlar görülürken, yarık damak hastalarının %54'ünde ek anomali görülmektedir [15]. Yarık damak/dudak erkeklerde daha sık görülürken izole yarık damak oranı kadınlarda daha yüksektir.

#### 2.1.2. Etyoloji

Alveoler yarık oluşumunda genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörler de etkilidir. Yarık oluşumunun çevresel faktörlerini; annenin gebelikte sigara, alkol ve uyuşturucu kullanımı, zayıf beslenme, viral enfeksiyonlar, A vitamini eksikliği ya da fazlalığı ve folik asit eksikliği gibi nedenler oluşturur [16]. Yarık oluşumunda genetik mekanizmalar da etkilidir ancak rahatsızlığı ortaya çıkaran spesifik bir gene rastlanmamıştır. Yarık dudak/damak'a sebep olan 200'den fazla spesifik gen listelenmiştir. İzole yarık damak oluşumuna ise 400'den fazla bozukluğun bileşeninin sebep olduğu görülmüştür [17].

#### 2.1.3. Embriyoloji

Damak, primer damak ve sekonder damak olmak üzere iki kısımda gelişir. Primer damak inter maksiller segmentte gelişmeye başlar ve maksillanın premaxiller kısmını oluşturur. Sekonder damak ise insanlarda sert ve yumuşak damağın %90'ını kapsayan premaxillanın posteriorundaki bölümdür. Palatogenez (damak oluşumu), intra-uterin hayatın 5. haftasında başlar, 12. haftada sona erer [18]. Damak gelişiminin en kritik dönemi 6. hafta ile 9. hafta arasındaki süreçtir [19]. Beşinci haftada iki parça olan mandibula ortada birleşir. Mandibuler ve maksiller çıkıntılar birleşerek ağız köşesini

oluşturur. Bu dönemde birleşme olmadığı durumda transvers yüz yarığı meydana gelir [20]. Yüz gelişimi süresince medial nazal, lateral nazal ve maksiller çıkıntılar birleşerek normal burun, üst damak ve dudak anatomisini oluşturur [21]. Yüz çıkıntılarının birleşme yerleri hassas bölgelerdir ve bu çıkıntılardaki herhangi bir gelişme veya yetersizlik yarık damak oluşumuna neden olmaktadır [22].

#### **2.1.4. Sınıflandırma**

Dudak damak yarıklarının sınıflandırılması günümüze kadar pek çok araştırmacı tarafından yapılsa da en sık kullanılan sınıflandırmalar; Kernahan ve Stark, Davies ve Richie ve Veau sınıflandırmalarıdır.

##### **Kernahan ve Stark Sınıflandırması**

- 1) Ön (primer) damak yarıkları
- 2) Arka (sekonder) damak yarıkları
- 3) Hem primer hem sekonder damak yarıkları
- 4) Tek taraflı (Unilateral) yarık dudak
- 5) İki taraflı (Bilateral) yarık dudak
- 6) Medyan yarık dudak şeklindedir [23].

**Ön (Primer) Damak Yarıkları:** Lateral damak çıkıntılarını meydana getiren mezenkimal hücrelerinin kendi aralarında ve primer damağı oluşturacak olan mezenkimal hücreleri ile tam olarak birleşmemesinden meydana gelmektedir. Primer damak yarıklarında burun tabanı da olaya katılıyorsa total yarıktan söz edilebilir [24].

**Arka (Sekonder) Damak Yarıkları:** Lateral palatal rafların mezenkimal hücrelerinin birbirleriyle ve nazal semptomla birleşmemesinden meydana gelmektedir [17]. Sekonder damak yarıkları foramen incisivuma uzanıyorsa total yarık oluşur [24].

**Hem Primer Hem Sekonder Damak Yarıkları:** Lateral palatal çıkıntıları oluşturan mezenkim hücrelerinin hem kendi aralarında hem de primer damak mezenkimi ve nazal semptom hücreleriyle birleşmemesinden meydana gelmektedir [25].

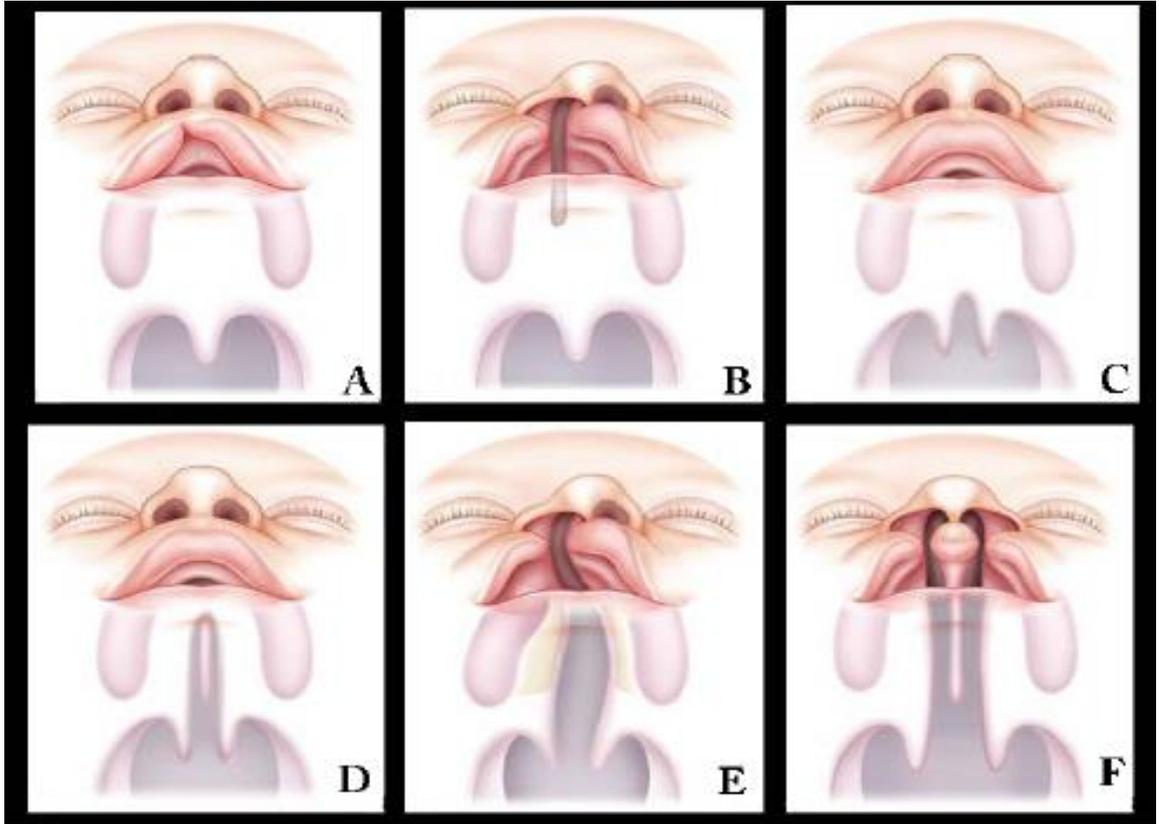
**Dudak Yarıkları:** Damaktan bağımsız olarak üst dudakta meydana gelen yarıklardır.

**Tek Taraflı Yarık Dudak:** Maksiller çıkıntının medial nazal çıkıntılar ile tam olarak birleşmemesinden meydana gelmektedir.

**Çift Taraflı Yarık Dudak:** İki taraflı maksiller çıkıntının medial nazal çıkıntı ile tam olarak birleşmemesinden meydana gelmektedir.

**Medyan Yarık Dudak:** Medyan nazal çıkıntılarının tam ya da kısmi birleşmemesinden kaynaklanmaktadır.

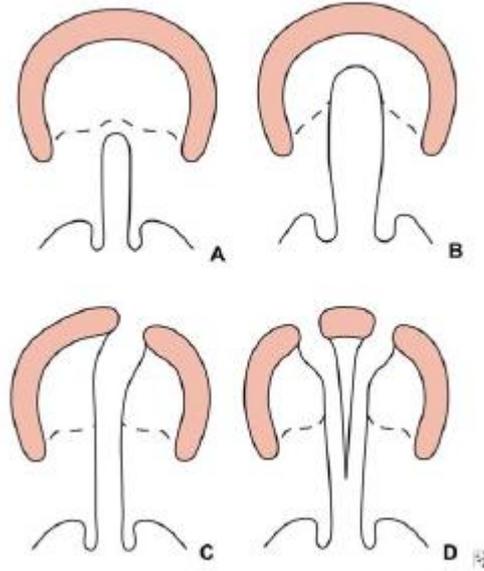
**Alt Dudak Yarıkları:** Sağ-sol Mandibular çıkıntıdaki mezenşim hücrelerinin ortada birleşmemesinden oluşmaktadır [26].



**Şekil 2.1.** Kernahan ve Stark sınıflandırması [27]. A) Tek taraflı inkomplet dudak yarığı. B) Tek taraflı komplet dudak yarığı. C) İnkomplet yarık damak. D) Komplet yarık damak. E) Tek taraflı komplet dudak ve damak yarığı. F) Çift taraflı komplet dudak ve damak yarığı.

## Veau Sınıflandırması

- 1) İzole yumuşak damak yarığı
- 2) Yumuşak damak, sert damak ve uvula yarığı
- 3) Tek taraflı dudak, alveol, yumuşak damak, sert damak ve uvula yarığı
- 4) Çift taraflı dudak, alveol, yumuşak damak, sert damak ve uvula yarığı



Şekil 2.2. Veau sınıflandırması [27].

A) İzole yumuşak damak yarığı. B) Sert damak, yumuşak damak ve uvula yarığı. C) Tek taraflı dudak, alveol, yumuşak damak, sert damak ve uvula yarığı. D) Çift taraflı dudak, alveol, yumuşak damak, sert damak ve uvula yarığı.

### 2.1.5. Tedavi Yöntemleri

Damak/dudak yarıklarının tedavisi 3 aşamadan oluşur; erken tedavi, yardımcı tedavi, yetişkin tedavi.

**Preoperatif maksiller ortopedik tedavi (erken tedavi):** Erken tedavide amaç, bebeğin beslenmesini sağlamaktır. En geç bir hafta içinde tedaviye başlamak daha uygundur. Eğer mümkünse doğumu izleyen ilk günde, emme refleksi başlamadan, beslenme aparatının takılması önerilir. Beslenme aparatı, yumuşak dokunun kapanmasına kadar kullanılır.

Bebek 3 aylık iken yarık dudak, 15 aylıkken de yarık damak 2 etaplı kapama yöntemiyle kapatılır. Yaygın olarak tercih edilen palatoplasti yöntemleri; Von Langenbeck tekniği, Milard tekniği, Veau-Wardill-Kilner pushback tekniği, Furlow double-reversing z plasti tekniği, intravelar veloplasti ve uvuler yer değiştirme teknikleri olarak sıralanabilir [28].

**Postoperatif ortopedik ve ortodontik tedavi (yardımcı tedavi):** Büyüme ve gelişme döneminde veya ortodontik tedavi esnasında geçici protez uygulanmaktadır. Bu sayede kas aktivitesinde artış sağlanıp, cerrahi müdahale ile konjenital defektin düzeltilme ihtimali artmaktadır.

**Yetişkin Tedavi (protetik tedavi):** Defekt bölgesi kansellöz kemik grefti (kalça-iliyak kemiği) ile kapatılır [21].

## **2.2. Kemik Greftleri**

Travma, kemik enfeksiyonları, konjenital malformasyonlarda, kas ve iskelet sistemi tümör cerrahisi, spinal cerrahi gibi rekonstrüktif işlemler sırasında oluşan kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla destekleyici ve kemik yapımını uyarıcı etkilerinden dolayı kemik greftleri ve kemik yerine geçebilecek malzemeler (implantlar) sıklıkla kullanılmaktadır [29]. Kemik grefti olarak otojen, allojen, ksenojen ve alloplastik kemik greftleri kullanılır [30]. İdeal bir kemik grefti dokularla tamamen uyumlu olmalı, biyolojik olarak inert olmalı, kolayca şekil alabilmeli ve dayanıklı olmalıdır [5].

Kemik oluşumunu sağlamak için kemik greftlerinin sahip olması gereken dört unsur vardır. Bunlar;

**Osteointegrasyon;** Kemik ile greft arasında kemik dışında herhangi bir doku (fibröz doku) olmaksızın, greftin kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunmasıdır [7, 31]

**Osteokondüksiyon;** Alıcı kemikten vasküler ve prevasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu desteklemesidir [32]. Diğer bir ifadeyle osteoblastları veya osteoblastlara dönüşecek canlı hücreleri koruma özelliğidir [33].

**Osteoindüksiyon;** Pluripotent hücrelerin (mezenkimal hücreler) çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyarabilme özelliğidir. Mezenkimal hücreler greftin etrafındaki bağ dokusundan gelir ve demineralize kemik matriksinde bulunan kemik morfojenik proteini (BMP) ile osteoblastlara dönüşerek yeni kemik yapımını uyarır [32].

**Osteogenezis;** Greft materyali içindeki hücrel elemanlarının, transplantasyon sonrası hayatta kalarak implante edilen alanda yeni kemik oluşumunu sağlama özelliğidir [7].

### **2.2.1. Otojen Kemik Greftleri**

Otojen kemik greftleri kemik dokunun yeniden oluşumu ve devamlılığı için osteoprogenitör hücreler, osteoindüktif büyüme faktörleri ve osteokondüktif matris sağlar [34]. Aynı zamanda içerdikleri osteoblast, kemik iliği ve kan hücreleri ile osteogeneze katkı sağlayıp ve immünolojik problem oluşturmazlar. Otogreftler; kansellöz (spongioz), kortikal ve kortikokansellöz (kortikospongioz) olmak üzere 3 şekilde olabilir. Spongioz kemik greftleri, medüller kemik ve kemik iliği içerir. Geniş yüzeyi ve partiküler yapısı ile hızlı bir şekilde revaskülarize olurlar. Küçük kemik kayıplarında iyi bir greftleme için yeterli olurken, periostun bulunmadığı durumlarda ve daha büyük kemik kayıplarında ise tercih edilmemektedir. Kortikal greftler, lameller kemiklerdir ve osteosit hücreleri yönünden zengindir. Bu greftler daha çok kemik morfojenik proteini içerdiklerinden dolayı kemik endüksiyon kapasitesi oldukça yüksektir fakat osteogenezisi artırıcı özellikleri yoktur [34]. Kortikokansellöz greftler ise kortikal kemik ve altında bulunan kansellöz kemikten oluşur. Bu tip kemikler hem osteoblastları içerir hem de yapısal bütünlük sağlar. Otojen kemik grefti uygulamalarında genellikle iliyak kemik, kalvaryal kemik, kostalar, mandibular simfizis ve tibiadan alınan greftler tercih edilir. Bu greftlerin içerisinde iliyak krestten alınan greft; morbiditesinin düşük olması, çocuklarda bile yeterli miktarda bulunması ve fazla miktarda osteoblastik hücre içermesi nedeniyle “altın standart” olarak kabul edilir [5, 35].

Otojen kemik greftinin avantajları yanında dezavantajları da mevcuttur. Bu dezavantajlar 1-2 hafta kadar sürebilen şiddetli ağrılar, grefti elde etmek için ikinci bir cerrahi operasyona gerek duyulması, kan kaybı ve enfeksiyon gözlenmesi şeklinde sıralanabilir [5, 36]. İliyak kemik grefti ile birlikte oluşan yürümede aksaklıkların yaşanması, kalvariyal kemik greftlerinde meydana gelen dura ve serebral yaralanma ihtimali ve kosta

grefti sonrasında yaşanacak pneumotoraks ve göğüs enfeksiyonu riski nedenleriyle de aileler soğuk bakmaktadır [37, 38].

Yukarıda bahsettiğimiz gibi doğal greftlerin kullanımındaki sınırlamalardan ötürü çeşitli alternatiflerin yanı sıra malzeme biliminin de gelişmesiyle birlikte sentetik, polimerik ve metalik biyomalzemeler üzerinde yoğunlaşmış ve klinikte uygulama sahası bulunmuştur [39]. Bu bağlamda doku mühendisliği, ikincil bir operasyona gerek bırakmayan ve immün reaksiyonu geliştirmeyen skaffold üretimine hız kazandırmıştır [40].

Bu tez çalışmasında kullanılan çift katmanlı doku iskelesinin (skafold), trikalsiyum fosfat'ın osteokondüktif özelliği ve poli(gliserol-sebakat) elastomerinin osteoindüktif özellikleriyle, literatürde önem kazanmış altın standart olarak kabul edilen otogreft ile karşılaştırılması mümkün olmuştur.

### **2.2.2. Allojen Kemik Greftleri**

Allojen kemik greftleri türleri aynı, fakat genetik yapıları farklı olan türler arasında yapılan doku transferidir. Poroz yapıları içinde progenitör ve endotelial hücrelerin bulunduğu birçok alan bulunur [5, 7]. Allojenler; taze(fresh), taze donmuş(fresh-frozen), dondurularak kurutulmuş (freze-dried) ya da demineralize (demineralized) olarak elde edilirler.

Taze allogreft direkt olarak vericiden alıcıya alınır. Bu tür allogreftler aşırı miktarda immün yanıtı neden olurlar. Taze donmuş greftlerin oluşturulmasında, greft antibiyotikli solüsyonda yıkandıktan sonra  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulur. Ya da dondurularak kurutulmuş allogreftler antibiyotikli solüsyonla yıkandıktan sonra  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de tekrar dondurulur ve bir vakum yöntemi ile greft içindeki su içeriği % 5'in altına indirilir, kurutulur. Bu greftler ise çok az miktarda immünolojik yanıt gösterirler. Demineralize allogreftler ise allojen kemik 74-420  $\mu\text{m}$  partikül büyüklüğüne erişene kadar ezilir ve ardından 3 saat 0.5 N HCl mEq/gr'da muamele edilerek oluşturulur [41,42]. Osteokondüktif proteinler, taze donmuş ve demineralize olmuş kemiklerde kısmen korunmasına rağmen dondurularak kurutulmuş greftlerde ise bu özellik kaybolur [43].

Kemik morfojenik proteini ve büyüme faktörlerini içeren biyomalzemeler alveoler yarık tedavisinde sorgulanmaktadır fakat bu tür malzemeleri kullanmak için daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır [44].

Allogreftlere karşı alıcıda oluşan immün yanıt; greft içindeki osteojenik ve hematopoetik hücreler, lökositler, kan, damar ve sinir doku matrikslerindeki antijenlere karşı alıcının duyarlılığı oranında gelişir [45].

### **2.2.3. Ksenojen Kemik Greftleri**

Alıcıdan farklı bir türdeki vericiden elde edilen heterojen greft materyalleridir [28]. Genellikle başka memeli kemiklerinden elde edilir. At, domuz, sıçan kemiklerinin yanı sıra en çok tercih edilen ise sığır kemikleridir. Ksenojen greftler osteogenezise katılmazlar. İşlenmemiş kemik greftlerinin immünojenisiteleri allojenik greftlere oranla daha yüksektir [46].

### **2.2.4. Alloplastik Kemik Greftleri**

Kemik rekonstrüksiyonunda kullanılmak üzere sentetik olarak üretilen kemik doku iskeleleridir [47]. Otogreftlerin ve allogreftlerin kullanımındaki kısıtlılıklar nedeniyle biyoseramik teknolojisinin gelişimi hızlanmıştır [45]. Alloplastik kemik iskeleleri mercanlardan doğal olarak elde edilen hidroksiapatit (HA), sentetik hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) gibi seramikler, biyoaktif camlar, kalsiyum karbonat gibi malzemeler olabilmektedirler. Alloplastik implant uygulamalarında donör sahaya ve ek bir cerrahi müdahaleye gerek duyulmaz, aynı zamanda bu materyallerin birçoğu osteokondüktif ve osteoindüktif özellik taşıdıklarından onlara bazı avantajlar sağlamaktadır [48].

## **2.3. Kemik Doku**

Embriyo döneminde kıkırdak özelliğinde olan iskelet, kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonat gibi tuzların birikmesiyle kemikleşmektedir. Kemik doku;

- 1) İç organları korur ve onlara desteklik sağlar.
- 2) Kasların kendisine yapışarak vücudun hareketini sağlar.

- 3) Yapısındaki hematopoetik yapı ile kan ve kök hücrelerini kemik iliğinde üretir (uzun kemiklerde).
- 4) Vücudun gereksinimi olan bütün mineralleri kendi bünyesinde depolayan bir destek dokudur [49].
- 5) Vücuttaki kalsiyumun yaklaşık %99'u kemiklerde depo edildiği için günlük kalsiyum ihtiyacı bu dokudan sağlanır [50].
- 6) Sitokinler ve büyüme faktörlerini depo eder [51].

Kemik dokusu hücrelerden, ekstrasellüler matriksten (ECM) ve liflerden oluşur. Sert ve dayanıklıdır. Kemik dokusundaki bu sertliğin nedeni ekstrasellüler matriksin kalsiyum tuzları ile mineralleşmesinin sonucudur [52]. Cerrahi müdahaleler ile şekil değiştirebilen tek dokudur. Endokrin, metabolik ve beslenme şekli değişikliklerine karşı duyarlıdır [53]. Doğal kompozit bir malzemedir [50]. Eklem bölgeleri hariç kemikler periosteum denilen osteojenik potansiyele sahip özel bir bağ doku yapısıyla örtülüdür. Bu tabaka kemik oluşturma yeteneğine sahiptir. Periosteum aynı zamanda lenf damarlarının ve duyu sinirlerinin bulunduğu bir ağ yapısındadır [53]. Periosteum kemik onarımı, büyümesi ve beslenmesi açısından önemlidir [54]. Embriyonik ve doğum sonrası dönemde periosteumun iç tabakasında osteoblast denilen kemik oluşturan hücreler yer alırken, erişkin dönemde bu hücrelerin yerini osteoprogenitör hücreler almıştır. Hücreler lakün adı verilen boşluklarda yer almaktadır. Periosteumun dış tabakası ise hücresiz sıkı bir bağ dokudan ve kan damarlarından meydana gelmektedir. Kemik iliğini bulduran, kemik boşluklarının duvarlarını döşeyen, osteojenik hücrelerin oluşturduğu kemik tabakasına ise endosteum denilmektedir. Endosteumun hem kemik hem de kan hücresi yapabilme kabiliyeti vardır. Kemikte bulunan tüm boşluklar, havers ve volkman kanalları ve süngerimsi kemiğin ilik boşlukları tamamen endosteum ile kaplıdır [53].

### **2.3.1. Kemik Doku Tipleri**

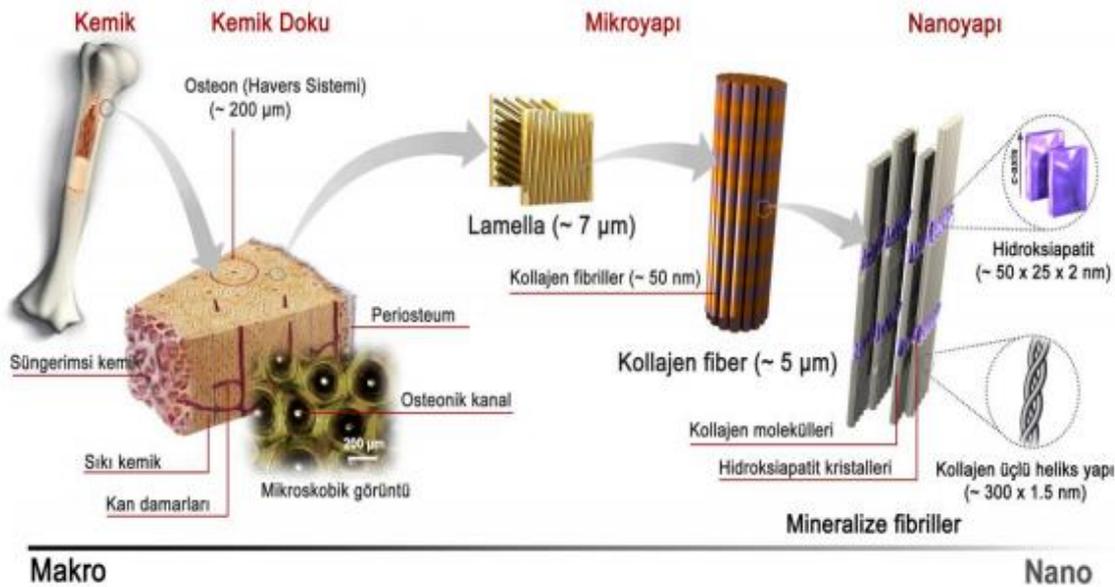
#### **2.3.1.1. Kompakt Kemik (Kortikal Kemik-Lameller Kemik)**

Uzun kemiklerin diyafizi kompakt kemik yapısında olmakla birlikte yine uzun kemiklerin epifizi ile kısa ve yassı kemikler de kompakt kemik dokusundan oluşan ince bir kabuk yapısına sahiptir. Kortikal kemiğin uzun eksenine boyunca birbirine paralel uzanan kanallar bulunmaktadır. Bu kanallar "Havers" kanallarıdır. Longitudinal Havers kanallarının

çapı 20-110 mikron civarındadır. Havers kanallarının çevresinde ise 3-7  $\mu\text{m}$  kalınlığındaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluşan bir yapı vardır. Bu yapıya ‘‘osteon’’ denilmektedir. Her bir lamelde ‘‘laküna’’ adı verilen yapılar bulunur ve lakünaların içerisinde osteositler yer alır [51, 54]. Havers kanallarının kemik iliği ve periosteum ile bağlantı kurmasını sağlayan transversal yapılar ise ‘‘Volkman’’ kanallarıdır [53, 55]. Volkman kanalları periosteumdan endosteuma kadar uzanır ve periosteum ile endosteumdan gelen kan damarları volkman kanalları aracılığıyla havers kanallarına iletilir [53]. Havers ve Volkman kanalları aynı zamanda arteriyol, venül, kılcal damar ve sinirlerin bulunduğu nörovasküler kanallardır [56].

### 2.3.1.2. Kansellöz Kemik (Trabeküler Kemik-Süngerimsi Kemik)

Uzun ve kısa kemiklerin epifiz ve metafiz bölümlerinin iç kısımları ile yassı kemiğin iç yüzeyinde bulunur. Süngerimsi kemiğin yapısını anastomozlaşarak üç boyutlu bir ağ şeklini alan kemik trabekülleri oluşturur. Trabeküller düzensiz şekilli olup içleri yerine göre kırmızı veya sarı kemik iliği ile doludur. Trabeküler yapı, stoplazmik uzantıları aracılığıyla kemik iliğindeki kan damarlarından besin maddelerini alır. Süngerimsi kemiğin mekanik etkilere karşı dayanımı kompakt kemiğe göre oldukça düşüktür [53, 57].



Şekil 2.3. Kemik dokusunun hiyerarşik yapısı [58].

### 2.3.2. Kemik Doku Matrisi

Kemik dokusunun %25'ini organik matris, %70'ini inorganik matris ve %5'ini de su oluşturur [59]. Organik kısım; kollajen lifler (tip-I ve tip-V), glikozaminoglikanlar (kondroitin/keratan sülfat), hyalüronik asit, glikoproteinler (osteonektin, osteokalsin, alkalın fosfataz) ve dönüştürücü büyüme faktörlerinden (TGF- $\beta$ ) meydana gelmektedir [57]. Organik matris (osteoid) kemiğe esneklik kazandırır [60]. Bu esnekliği kemiğe kazandıran ve kemiğin lifli çatısını oluşturan kollajen proteindir [61]. Vücuttaki proteinin takribi dörtte birini kollajen proteini oluşturur. Kemik doku, kırık doku, eklem ve liflerde bulunmaktadır [62]. Kollajen proteinler çapraz bağ yapılıdır ve liflerin genişliği 50-70 nm kadardır [63]. En çok fibroblastlar tarafından sentezlenen fibriller olup bununla birlikte osteoblast, odontoblast, kondroblastlarda da sentezlenebilmektedir [62]. Kollajen fibriller aynı zamanda hidroksiapatit birikimini sağlar.

Kemik matrisinin inorganik bileşenlerini ise hidroksiapatit kristalleri şeklinde bulunan kalsiyum ve fosfat, sitrat ve magnezyum oluşturur [54]. Hidroksiapatit,  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  formundadır [51]. Biyoyumluluğu, biyoaktivitesi ve mineral bileşenleri sayesinde biyomedikal ve diş hekimliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [64]. Hidroksiapatit kristalleri kollajen fibrilleri içinde depo edilmiş olup etrafı su ve iyonlardan oluşan bir tabaka ile sarılmıştır. Vücutta kalsiyum ve fosfor ihtiyacının karşılanmadığı durumlarda bu tabaka kemikten kana kalsiyum ve fosfor verilmesini sağlar [65]. Kemik inorganik fazı, kemiğin cinsiyeti ve yaşına bağlı olarak değişir. Bununla birlikte yaşlanmaya bağlı olarak mineral matrisde kalsiyum ve karbonat oranı artarken, fosfat, magnezyum ve su oranı azalır [66].

Kemik dokunun organik kısmı kemikten ayrılırsa geriye kalan mineralize kısım kemiğin kırılabilir hale gelmesine sebep olurken, inorganik kısım kemikten ayrılırsa kemik esnek bir hal alır. Bu nedenle kemik matrisini meydana getiren bu protein-kristal kombinasyonu birbiriyle uyumlu olarak kemiğe dayanıklılık ve esneklik kazandırır [67].

### 2.3.3. Kemik Doku Hücreleri

Hücreler;

- 1) Osteoprogenitör (Osteojenik) hücreler
- 2) Osteoblastlar
- 3) Osteositler
- 4) Osteoklastlar

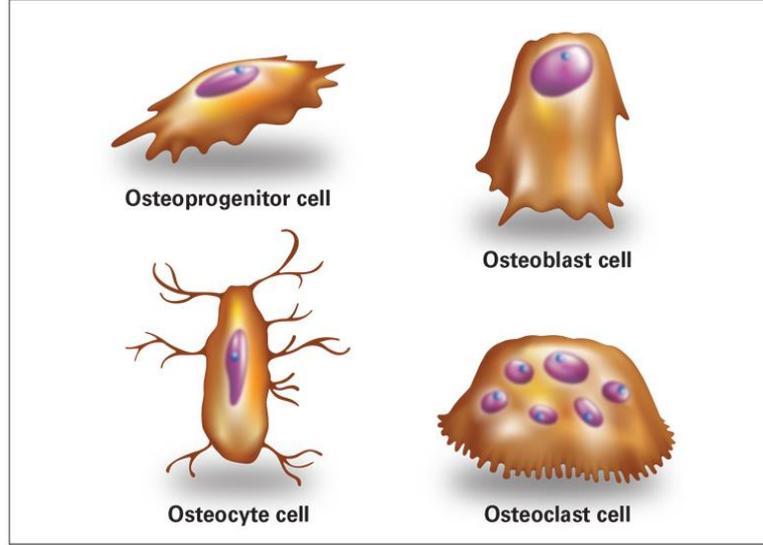
**Osteoprogenitör Hücreler:** Farklılaşmamış osteoblast öncülü (progenitör) mezenkimal kök hücrelerdir. Düşük oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücrelere, yüksek oksijen konsantrasyonunda ise mitoz bölünme ile osteoblastlara dönüşmektedirler. Osteoprogenitör hücreler periosteum, endosteum ve havers kanallarında bulunur [56].

**Osteoblastlar:** Kemik yapımını sağlayan, kemik dokusunun hücrel ara maddesini ve kollajen fibrillerini salgılayan hücreler olup embriyonik yaşamda mezenşim hücrelerinden, daha sonraları ise bağ dokunun genç fibrositlerinden (fibroblastlar) farklılaşırlar. Osteoblastlar gelişmekte olan yeni kemik dokusunun yüzeyinde tek sıra halinde dizilerek kısa uzantılarıyla birbirlerine, komşu mezenşim hücrelerine ve bağ dokusu hücrelerine bağlanırlar. Sitoplazmaları bazofiliktir. Bunun nedeni sitoplazmada ribonükleik asitten zengin ribozomların bol miktarda bulunmasıdır. Ayrıca osteoblast sitoplazmasında granüler endoplazmik retikulum ve golgi aparatı gelişmiş olup glikojen ve özellikle alkalin fosfataz bol miktarda bulunmaktadır [53].

**Osteositler:** Osteoblastların kendi etraflarına hücrel ara maddeyi salgılayarak oluşturduğu hücrelerdir [56]. Görevi, matriksin organik kısmını sentezlemektir. Kemik matriksinde lakünalar içine yerleşmiştir. Kemik hücrelerinin yaklaşık %90-95'ini oluştururlar. Bölünme yetenekleri yoktur. Osteositler, siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve insülin benzeri bir büyüme faktörü salgılayarak osteoblastik evrenin son safhasını oluştururlar [68]. Yaşlanıp ölen osteositlerin buldukları yerdeki matriks daha sonra osteoklast sayesinde yok edilir [53, 69].

**Osteoklastlar:** Osteoklastlar kemik yıkımından (rezorpsiyon) sorumlu, çok çekirdekli kemik hücreleridir. "Howship lakünası" adı verilen rezorpsiyon bölgelerinde yer almaktadırlar [70]. Osteoklastlar plüripotent hücrelerden köken alır ve prekürsörleri dalak, kemik iliği, akciğer, periton ve periferik kanda bulunur [71]. Sitoplazmaları

bazofiliktir fakat bu bazofilik durum osteoblastlar kadar olmayıp genellikle asidofilik özellik gösterirler. Doku kültüründe ameboid hareket yaparlar. Fagositoz güçleri zayıftır [53]. Osteoklastlar, salgıladıkları proteolitik enzimler ve asitler aracılığıyla organik matriksi ve kemik tuzlarını eriterek kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirirler [72].



**Şekil 2.4.** Kemik doku hücreleri (<https://glidewell dental.com/education/chairside-dental-magazine/volume-12-issue-3/bone-substitutes>)

#### 2.3.4. Kemik Oluşumu (Osteogenesis-Ossifikasyon)

Kemik doku oluşumu iki yolla gerçekleşmektedir; endokondrial kemikleşme, intramembranöz kemikleşme. Her iki kemikleşme türünde de önce primer kemikleşme sonrasında ise sekonder kemikleşme gözlenir [73]. İntramembranöz kemikleşmede mezenkimal hücreler, kemiği oluşturmak için kümelenir ve bir ossifikasyon merkezi oluştururlar. Sonrasında bu hücreler osteoblastlara farklılaşırlar, osteoblastlar da matriksin sertleşmesini sağlamak için hücre dışı bileşenlerini ve osteoidi salgılar. Kemik benzeri bu osteoid doku kemiği oluşturmak üzere kalsifiye olur. Periosteum şekillenir. Bu aşamaların devamında ise kemiğin her iki yanından başlayarak periost tabakaları oluşturulur. Birçok yassı kemik, mandibula, klavikula ve kafatasına ait bazı kemikler bu osteoid dokuyla ilişkili matriksten meydana gelmektedir [74-76]. Endokondriyal kemikleşme ise hyalin kıkırdaktan oluşmaktadır. İskelet sistemini oluşturan çoğu kemik endokondriyal kemikleşmeden köken alır. Endokondriyal ossifikasyonda intramembranöz kemikleşmeden farklı olarak öncelikle mezenkimal kök hücreler kondrositlere dönüşür. Oluşan kondrositler uzun, kısa ve düzensiz kemiklerin ilk modeli olan fibröz bağ doku

modeliyle yer değiştirir ve hyalin kıkırdakı oluşturur. Uzun kemiklerin diyafizinde gelişen bu kemikleşme merkezine “primer ossifikasyon merkezi” denir. Uzun kemiklerin epifiz kısımlarında oluşan kemikleşme merkezine ise “sekonder ossifikasyon merkezi” denir [74]. Oluşan kıkırdak, kıkırdak matriksini oluşturur. Matriks mineralize olurken besinlerin difüzyonu engellenir ve kondrositler ölür. Bu durum osteoblast, osteoklast ve hematopoetik hücrelerin öncüllerini taşıyan kan damarlarının bölgeye penetre olmasını sağlar. Osteoblast ve osteoklastlar kalsifiye olan kıkırdak matriksini süngerimsi kemiğe dönüştürür [51].

#### **2.3.4. Kemik İyileşmesi**

İçeriden veya dışarıdan uygulanan basınç, darbe ve travma gibi mekanik etkilerle kemiğin anatomik yapısının bozulmasına kemik kırığı denir. İyileşme, kırık oluştuktan hemen sonra başlar ve kırık hattında skar oluşmadan iyileşir [77]. Kırığın iyileşme süreci yaralanmadan itibaren yaklaşık 6-8 hafta sürmektedir. İyileşme biyolojik olarak karmaşık olup genel olarak primer ve sekonder olmak üzere iki kısımda incelenir [78].

##### **2.3.4.1. Primer Kemik İyileşmesi (Doğrudan-Direkt İyileşme)**

Fragmanlar arasında hareketin olmadığı, kırık uçlarının tam anatomik redüksiyonu ve rijit olarak tespitin yapıldığı durumda görülen kırık iyileşme biçimidir. Primer kemik iyileşmesi, tam temasta (kontakt) ve minimal boşlukta (gap) iyileşme olarak ifade edilebilir. Osteoblast ve osteoklast aktivitesiyle meydana gelir. Tam temasta iyileşmede kırık uçları arasındaki mesafe 0,01 mm den az iken gap iyileşmesinde bu mesafe 800 mikrometre – 1 mm arasındadır. Her iki iyileşme tipinde de anatomik olarak düzgün, biyomekanik olarak dayanıklı lamellar kemik oluşmaktadır [79].

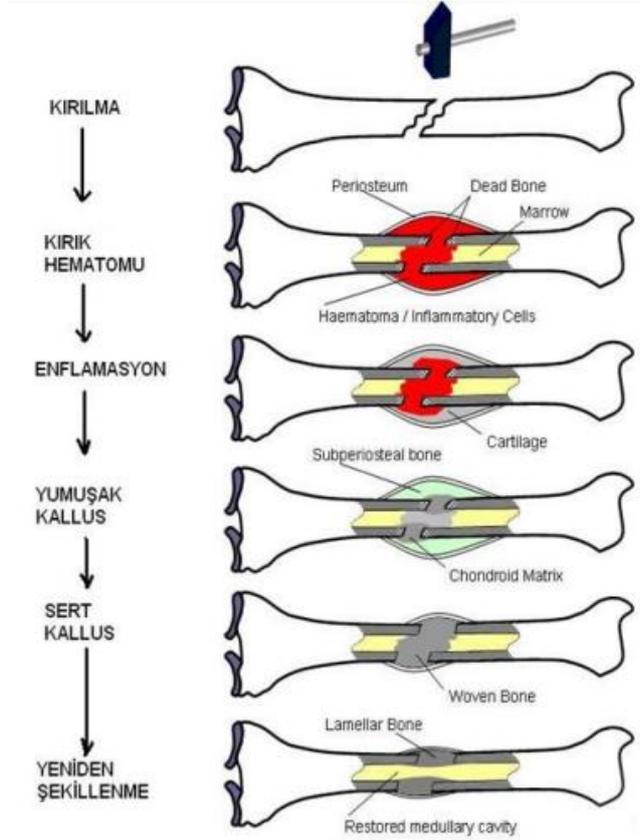
##### **2.3.4.2. Kemik iyileşmesi temelde ardışık üç fazda gerçekteşir;**

**İnflamasyon Fazı:** Travma sonrası kemik iliğini de içeren hematoma oluşur ve inflamatuvar yanıt başlar. Kırık hattı çevresinde ve kırık uçları arasında hematoma oluşur, hematopoetik kök hücrelerinin göçüne ve büyüme faktörlerinin acıya çıkmasına neden olur. Hematoma içindeki trombositlerin koagülasyonu ile trombosit kökenli büyüme faktörleri (PDGF) açığa çıkar, bunlar da onarıcı hücrelerin kırık hattına migrasyonunu

kolaylaştırır. Kırık bölgesindeki hasarlı kemik matriks dokusu ortama doluşan inflamatuvar mediatörlerin etkisi ile (TNF alfa, TGF beta, IL1 beta, IL6, IL17F, IL18 ve IL23) damarlar genişler, inflamatuvar hücrelerin (PMNL, makrofaj, lenfosit) bu bölgeye toplanması ve osteoprogenitör hücrelerin farklılaşarak aktif osteoblastlara dönüşmesine sebep olur. Bu İnflamasyon fazı ilk 24 saatte en yüksek seviyeye çıkar ve 7. günde sonlanır [80].

**Onarım Fazı:** Onarım evresi kırık iyileşmesinin en önemli fazıdır. Onarım fazının ilk başlarında kırıkta benzeri yeni kemik (kırıkta kallus) oluşur. Kallusun damarlanması ile yeni kemik oluşumu başlar. Anjiyogenezis (kan damarı oluşumu) ile birlikte beslenme yeterli düzeye çıkarsa osteoblastlar kallus içinde normal kemik gelişimine elverişli kemik matriksini sentezlemeye başlar. Bu fazda hücreler arası madde, yeni damarlar, fibroblast, destek hücreleri ve diğer hücreler farklılaşmaya başlar. Bu evre 7-12 gün sürer. Onarım evresinde rol alan hücreler genel olarak mezenkimal kökenli çok yönlü gelişim özelliğine sahip plüripotent hücrelerdir. Kırık bölgesinde mezenkimal hücre çoğalması ilk 16 saatte gerçekleşir [81].

**Kemiğin Yeniden Şekillenme Fazı (Remodelling):** Bu evre en uzun evre olup onarım fazının ortasından itibaren 4-6 hafta, aylar hatta yıllar sürebilir. Bu evrede kallus dokusu kalsifiye olarak kırıkta dokunun yerini orjinal kemik dokusu alır, trabeküler kemik dokusu oluşur. Kompakt kemik uçlarındaki kallus da lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara dönüşür. İlik kanalı adı verilen medulla yeniden şekillenir ve kanal içini dolduran kallus osteoklastlar tarafından geri emilir. Bu evreden sonra kemiğin eski haline döndüğü “şekillenme evresi” gelir ve 1-2 sene sürer [81].



**Şekil 2.5.** Kemik iyileşmesinin evreleri I) Hematom evresi; Kırık meydana geldikten sonra kemiğin defekt alanında kanama sonucu hematoma oluşur.

II) Enflamasyon evresi; Kırıklarda salınan sitokinlerin oluşturduğu yanıt, kanama sonrası “yangı” yani enflamasyon evresidir. III) Yumuşak kallus evresi (kıkırdak kallus); Kırık hattına çevredeki damarlardan, kırık alanı içerisine uzanan yeni damarlar meydana gelir (Anjiyogenez). Anjiyogenez ise endrokondrial ossifikasyon ile kıkırdak iç iskeletini (iç kallus), intra membranöz ossifikasyon ile dış kallusu oluşturur. IV) Sert kallus evresi (periosteal kemik kallus); Hipertrofik kondrositler apoptozise uğrar yumuşak kallusun mineralizasyonu gerçekleşir ve önce trabeküler kemik ardından lamellar kemik oluşur. V) Yeniden şekillenme evresi; primer lameller kemikteki kallus dokusu yeniden şekillenerek sekonder lamellar kemiğe dönüşür ve kemik dokusundaki dolaşım da normale döner.

### 2.3.5. Kemik Belirteçleri

Kemik yapımı ve yıkımı birbirini izleyen biyolojik bir döngüdür. Bu döngünün meydana gelmesini sağlayan temel etmenler osteoblastlar ve osteoklastlardır. Çocukluk ve

ergenlik döneminde yapım yıkımdan daha fazla olmaktadır. Bahsettiğimiz dönemlerde uzun kemiklerin uçlarındaki epifizer büyüme plağında kırıkta hücrelerinin kalsifikasyonu ile kemik büyümesi aşamalı olarak meydana gelir ve büyüme plağındaki kırıkta yerini olgunlaşmış kemik alır. Büyümenin durmasından sonra da kemiklerin yeniden yapımı ve yıkımı hayat boyunca kendini tekrar eden bir döngü şeklinde devam eder. Kemik dokusu bu döngüyle birlikte kendini sürekli yenilemektedir [82, 83].

Yapım ve yıkım ürünleri biyokimyasal belirteçlerle ortaya konulup osteoporoz gibi kemik dokusu sorunlarında ve kırıklarda kemik metabolizmasının durumu tespit edilebilmektedir.

### **2.3.5.1. Kemik Yapım Belirteçleri**

**Alkalen fosfataz (ALP):** Osteositlerin yeni sentezlediği ekstraselüler matrikse hidroksi apatit kristallerinin yerleşmesine olanak sağlayan bir enzimdir. Bu enzimin yaklaşık yarısı kemik, diğer yarısı ise karaciğer, böbrek ve plasenta kaynaklıdır [84]. Bundan dolayı alkalen fosfataz enzimi hepatik ve gastrointestinal izoenzimlerinin varlığı nedeniyle özellikle osteoporoz teşhis ve tedavisinde güvenilir bir kaynak değildir. ALP aktivitesi yaş, cinsiyet, menopoz ve ergenlik dönemlerinden etkilenmektedir [85]. Kemiğe özgü alkalen fosfataz, kemik yapımını ve mineralizasyonu göstermektedir. Bu enzimin aktivasyonu için çinko ve magnezyum gerekmektedir [86].

**Osteokalsin (OC):** Kemik matrikste en çok bulunan nonkollajenöz bir proteindir. 49 tane aminoasitten oluşmaktadır. Bu aminoasitlerden 17, 21 ve 24. asitler glutamik asittir. Bu nedenle osteokalsin proteinine aynı zamanda gla proteini de denilmektedir. Osteokalsin, osteoblastlar ve odontoblastlar tarafından sentezlenir. Gla proteinleri hidroksi apatit bağlama yeteneğine sahiptir [84, 87]. Osteokalsinin serum seviyesi genlere, yaşa ve böbrek fonksiyonlarına bağlıdır. Osteokalsin sentezi vitamin-D aracılığıyla olmaktadır [88]. İnsanda OC geni ALP ile birlikte birinci kromozomda lokalizedir. Dolaşımdaki OC düzeyi immünoassay yöntemi ile ölçülmektedir [89, 90].

**Prokollajen Tip 1 Propeptidleri (PCIP, PINP):** Prokollajen Tip 1, osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Kemik yapımının referansı olarak kabul edilmektedir [84]. Mineralize kemiklerde bulunan Tip 1 kollajen üçlü heliksel yapıya sahiptir ve bağ dokuda fibröz form oluşturmaktadır. Prokollajen Tip 1, kollajen üretimini ve büyümeyi

sağlamaktadır. PCIP (prokollajen karboksiterminal propeptid) ve PINP (prokollajen aminoterminal propeptid) çocukluk çağında büyüme hızını arttıran etmenlerdir [91]. Bu propeptidler immünoassay ve ELISA teknikleriyle ölçülmektedir [84].

### **2.3.5.2. Kemik Yıkım Belirteçleri**

#### **Kollajen Kaynaklı Proteinler**

Hidroksiprolin

Hidroksilizin-glikozidleri

Pridinolin

Deoksiipridinolin

Tip 1 Kollajen Karboksiterminal crosslinked telopeptit (CNX)

Tip 1 Kollajen aminoterminal crosslinked telopeptit (NTX)

Kollajen 1 Alfa 1 helikoidal peptit

#### **Non-kollajen Proteinler**

Kemik siyaloprotein (BSP)

Osteokalsin fragmanları

#### **Osteoklast Enzimleri**

Tartarat rezistan asit fosfataz

Katepsin K

RANK

### **2.4. Doku Mühendisliği**

“Doku Mühendisliği” terimi ilk defa 1987 yılında Kaliforniya Üniversitesi’nde Dr. YC. Fung tarafından belirtilmiş olup doku mühendisliği yaklaşımı tam anlamıyla Massachusetts Teknoloji Enstitüsü’nden (MIT) kimya mühendisi Prof. Robert Langer ve Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden cerrah Prof. James Vacanti’nin ortak çalışmalarıyla tanımlanmıştır ve 1990’lı yılların başından itibaren de bu alandaki çalışmalar başlamıştır [92]. Doku mühendisliği, mühendislik bilimlerinin (malzeme mühendisliği, biyomedikal mühendisliği) ve yaşam bilimlerinin (biyoloji, kimya, moleküler biyoloji) prensiplerini bünyesinde barındıran disiplinler arası bir bilim dalıdır.

Doku mühendisliğinin çalışma alanları doku ve organların iyileştirilmesi, geliştirilmesi ve yeniden oluşturulması şeklinde sıralanabilir [93]. Doku mühendisliği dört bileşenden oluşmaktadır. Bunlar hücreler, doku iskeleleri, biyoreaktörler ve biyosinyallerdir. Bu bileşenlerin içinde diğer bir adıyla skaffold dediğimiz doku iskeleleri, hücrenin mikro çevresini taklit etmek amacıyla genellikle polimer, seramik veya bunların bileşimi olan kompozit malzemelerden üretilen biyoyumlu ve biyobozunur malzemelerdir. Bu üç boyutlu biyomalzemeler, ekstrasellüler matriksi taklit edecek biçimde tasarlanır ve hücrelerin uygun yapışma yüzeyi sağlamalarına, çevre dokularla iletişim kurmalarına, mekanik dayanım sağlamalarına ve fizyolojik ve biyolojik değişikliklere cevap vermelerine yardımcı olurlar [94].

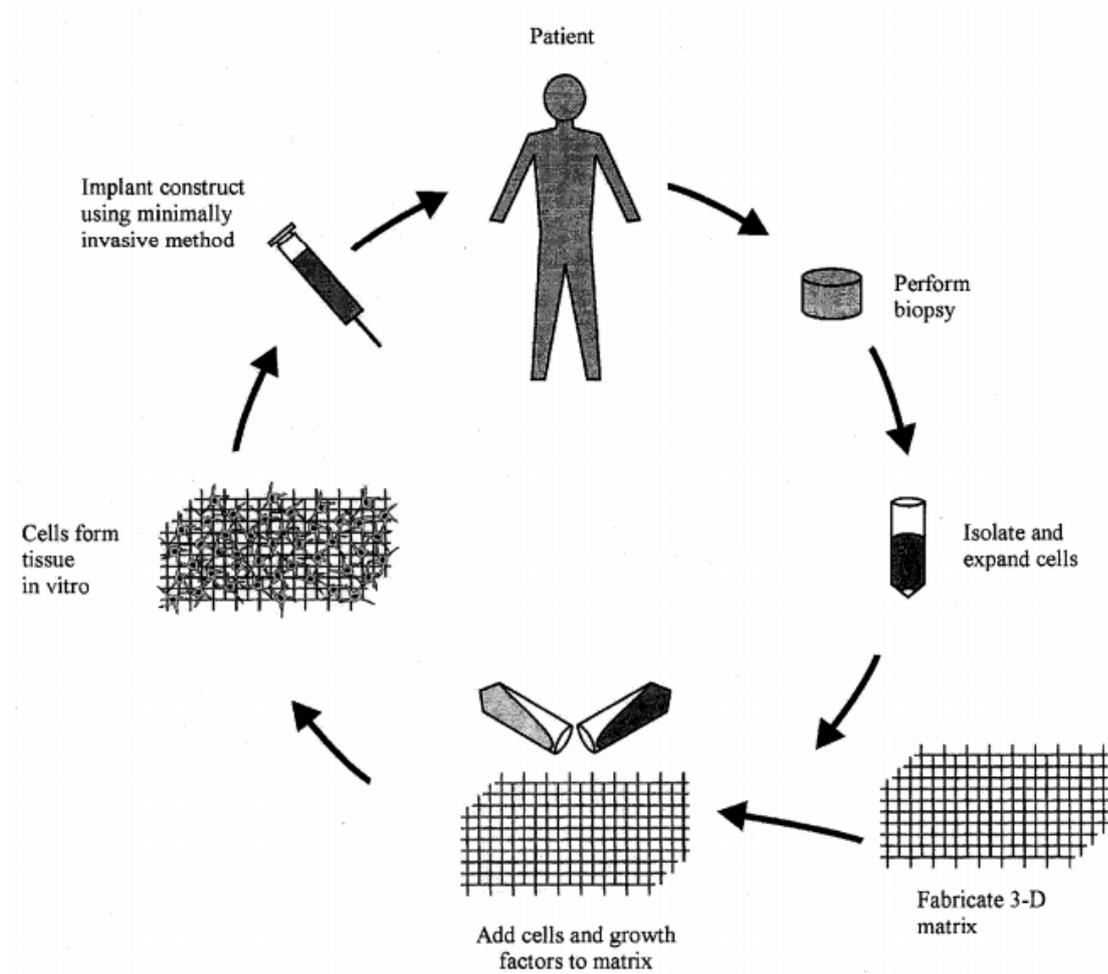
Doku mühendisliğinde kullanılan hücreler ya doğrudan onarımı yapılacak dokunun hücreleridir (primer hücre) ya da farklılaştırılmış kök hücrelerdir. Kök hücreler; embriyonik kök hücre, uyarılmış pluripotent kök hücre ve yetişkin multipotent kök hücre şeklinde doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Yetişkin hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanmasıyla meydana getirilen uyarılmış pluripotent kök hücre keşfi doku mühendisliği çalışmaları için önemli bir adım olmaktadır [95]. Öte yandan yetişkin kök hücre kaynağı olarak genelde kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kullanılmaktadır [96, 97]. Kemik iliği, uygun induktif ajanlar varlığında yüksek potansiyelde osteoblastik hücrelere dönüşebilme yeteneğinden dolayı en yaygın kullanılan bir kaynaktır [98].

Biyoreaktörler; dokunun kombinasyonlarının bir araya getirilmesi, entegre edilmesi, büyümesi ve şekillenmesi amacıyla laboratuvar koşullarında oluşturulan in vitro alanın, hücrenin in vivo alanının fizyolojik koşullarını taklit edecek şekilde gerçekleştirilmesini sağlayan cihazlardır. Bu cihazlar ile hücre kültür ortamı için gerekli şartların-uyarının yanı sıra besin, oksijen, pH ve sıcaklık gibi biyokimyasal ve fiziksel unsurlar da sağlanmış olur [99].

İn vitro ortamlarda hücrelerin göçünü ve farklılaşmasını sağlayan unsur ise biyosinyal molekülleridir. Proteinler, büyüme faktörleri ve peptitler hücre yapışmasını artırmak ve nihayetinde dokuyu yeniden üretmek amacıyla biyomateryallerin yüzeylerine iyonik veya kovalent bağ ile bağlanırlar. Özellikle kemik dokuda laminin, osteopontin,

osteonektin, elastin dahil olmak üzere kollajen veya kollajen olmayan proteinler biyosinyal görevi görmektedirler [100].

Günümüzde doku ve/veya organa yönelik doku mühendisliği çalışmaları kalp ve damar, kemik, kırık, karaciğer ve solunum sistemi gibi birçok alanda yapılmaktadır. Bu çalışmalarda kliniğe aktarılan modellerin, 3 boyutlu kültür ortamlarının ve biyoreaktörlerin dinamik hücre kültürü ortamına uygun olarak yapılması doku mühendisliği çalışmaları için önem teşkil etmektedir [99].



Şekil 2.6. Doku Mühendisliği Yaklaşımı

## 2.5. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında temel hedef, kemik kaybı/kırığının olduğu anatomik bölgede uygun olumlu yanıtın oluşmasını sağlamaktır. Kayıp kemik yeniden

oluşup, çevresi ile yapısal bütünlük (integrasyon) gösterdiği zaman başarı sağlanmış olur [101]. Kemik doku mühendisliğinin uğraş alanı, otogreft, allogreft, ksenogreft gibi doğal greftler, metalik, polimerik, seramik ve kompozit yapıları sentetik greftler ile üçüncü jenerasyon olarak kullanılan ve moleküler düzeyde biyo uyumlu biyomalzemeler ile canlı hücrelerin kullanıldığı, yapay doku ve organ üretimini esas alan doku mühendisliği alanları oluşturur [39, 102].

Klinikte halen kullanılmakta olan ve osteojenik canlı hücre içeren tek greft hastanın kendi vücudundan alınan otogreftlerdir. Fakat otojen greftte donör saha morbiditesi ve kısıtlı kaynak sıkıntısı olduğundan dolayı kullanımında kısıtlılıklar mevcuttur. Ayrıca greftin erimesi, donör alanda skar ve ağrı, anestezi süresinin uzaması gibi ek riskleri de taşımaktadırlar. Osteojenik hücre bulundurmeyen ve yoğun-farklı sterilizasyon işlemleri gerektiren allogreft ve ksenogreftler osteoindüktif özelliğe sahip değildirler. Bunlar sadece yapısal destek sağladıklarından klinikte yetersiz kalmalarına yol açmaktadırlar [103, 104].

Doğal greftlerin kullanımındaki bu kısıtlamalar nedeniyle çeşitli alternatifler üzerinde durulmuş, malzeme biliminin de gelişmesiyle birlikte metalik, seramik ve polimerik olan sentetik greftlere yönelim artmıştır [39].

Kemik doku mühendisliğinde sentetik greftlerin kullanımında kritik özellik gözenekli bir skaffoldlardır. Skaffoldun gözenekli olması, ekimi yapılacak hücre için yerleşeceği yatak rolü oynayacağı için hücrenin beslenmesi ve çoğalması için de önemlidir [105].

Metaller, biyolojik çevrede biyobozunur olmadıkları ve işlenebilirlikleri kısıtlı olduğu ve kemiğe entegrasyon sorunları için greft materyali olarak pek tercih edilmeseler de mandibuler, temporomandibuler eklem (TME) deformiteleri ve kontur düzeltmelerinde genellikle paslanmaz çelik (316L), titanyum bileşikleri ve krom-kobalt-molibden alaşımları kullanılabilirler [105, 106].

Seramikler, çok düşük gerilme kuvvetine sahip olup kırılma yapılarından dolayı eğilme ve bükülme gibi özellikleri olmadığı için kullanımları sınırlıdır. Hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat gibi kalsiyum fosfat bileşikleriyle kalsiyum sülfat tuzları biyomalzeme olarak kullanılan seramikler arasındadır. Kristalizasyon oranları yüksek olan ve yılda

yaklaşık %5-10 oranında rezorbe olan hidroksiapatit (HA), “yavaş rezorbe olan seramikler” arasında yer almaktadır [107].

### 2.5.1. Tri-Kalsiyum Fosfat (TCP)

Poroz yapıları ve hızlı çözünürlükleri ile TCP tozları “hızlı rezorbe olan seramikler” grubunda yer almaktadır. TCP seramiği  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  kimyasal yapısındadır. %90 gözenekli yapısıyla ve osteokondüktif özelliğiyle yeni kemik oluşumunu sağlamaktadır [108]. Gözeneklerinin büyüklüğü 100 ile 300  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir [109]. TCP materyalinin tek başına ve kemik morfojenik proteinleri, büyüme faktörleri ve sığır kollajeni ile kombine kullanımına dair çalışmalar bulunmaktadır [110]. TCP seramiği vücutta hidroksiapatitten daha hızlı çözünmektedir. Bunun sebebi ise Ca/P oranının hidroksiapatite göre düşük olup, değerinin 1.5 olmasıdır. Bu oranın düşük olması materyalin vücutta emilimini arttırmaktadır [111].

TCP'nin yapısındaki kalsiyum fosfat sayesinde osteoklast aktivitesi artmakta, bu artış da aynı zamanda yeni kemik oluşumunu sağlayan osteoblastların önünü açarak aktive etmektedir [109].

TCP'nin 1125 °C üzeri sıcaklıkta sinterlenmesi (daha küçük kristallerin yüksek sıcaklıkta füzyonu) sonucu  $\alpha$ -TCP, 1125 °C'nin altındaki bir sıcaklıkta sinterlenmesi sonucu  $\beta$ -TCP oluşmaktadır.  $\beta$ -TCP rezorbsiyon hızı  $\alpha$ -TCP'ye oranla daha yüksektir ve yaklaşık 6-7 ay kadar sürede yerini yeni kemiğe bırakmaktadır.

$\beta$ -TCP her ne kadar iyi bir osteokondüktif özellik gösterse de doku mühendisliği uygulamalarında yeni oluşan kemik miktarı, rezorbe olan TCP miktarından daha az olduğu için bu oranı yükseltmek ve osteoindüktif potansiyeli arttırmak amacıyla deneylerde TCP biyomalzemesi içeren greft materyalleri tercih edilmektedir [112].

Kemik doku mühendisliğinde doğal ve sentetik olmak üzere biyoyumlu ve biyobozunur polimerler de büyük bir öneme sahiptir [40].

Doğal polimerler, bünyelerinde barındırdıkları yüksek biyoyumluluk ve hücre yapışmasını sağlayan ligandlar sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla

tercih edilmektedirler [113]. Çoğunlukla, doku iskelesi üretiminde kitosan, aljinat, hyalüronik asit gibi polisakkarit bazlı doğal polimerler ile albümin, kollajen, jelatin, ipek ve fibrin gibi protein bazlı doğal polimerler kullanılmaktadır [114].

**Kitosan:** Yengeç ve karides gibi kabuklu deniz canlılarının dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarında bulunan, kimyasal yapısı bakımından selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan aminopolisakkarit, yani bir biyopolimerdir [115].

**Aljinat:** Esmer alglerden türetilen ve bir polisakkarit olan aljinat, genellikle ilaçların, büyüme faktörlerinin ve hücrelerin kapsülasyonunda kullanılmaktadır. Aljinatın vücutta tam olarak bozulmama ve immün cevap oluşturma gibi dezavantajları mevcuttur [116].

**Hyalüronik Asit:** Bağ dokunun ekstrasellüler matriksinde bulunan bir polisakkarittir. Hyalüronik asit, hayvansal kaynaklardan, bakteri fermentasyonundan ya da doğrudan izolasyon ile elde edilir. Hyalüronik asit, dokuların hidrasyonu ve nemlendirilmesinde, dokulardan madde geçişinde ve hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır [117].

**Kollajen:** Vücut proteinlerinin ve bağ dokusunun önemli yapısal elementidir. Bulunduğu organlarda yapısal bütünlüğü korumakla görevlidir. Heliks uzunluğuna ve yapısına bağlı olarak 13 tipte kollajen bulunmuştur. Bunlardan Tip-1 ve Tip-5 kollajen fibrilleri kemiğin yapısında yer alırken, Tip-2 ve Tip-11 kollajen fibrilleri eklem kıkırdağında bulunmaktadır [118].

**Jelatin:** Kollajenin denatürasyonu ile elde edilen ve vücutta, deride, tendonlarda ve kemikte bulunan bir proteindir. Aynı zamanda domuz derisi, sığır derisi, balık derisi ve balık kemiğinde de bulunmaktadır. Kollajen ile kıyasladığımızda jelatin, daha ucuz ve elde edilmesi daha kolay olduğu için daha çok tercih edilen biyomalzemedir. Jelatinin, çözeltilerde kullanılan miktarları ve çapraz bağlanma miktarları değiştirilerek malzemede istenilen biyobozunurluk seviyesi ayarlanabilmektedir. Gıda, farmasötik ve medikal alanda oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir [119, 120].

**İpek:** Cerrahi uygulamalarda dikiş ipi olarak kullanılan doğal bir polimerdir. İpek böceklerinden ve örümceklerden elde edilen ipek filamentlerinin temel yapısını, serisin proteini oluşturur. Mekanik dayanımından ve biyouyumluluğundan dolayı ipek, biyomedikal uygulamalarda ve doku mühendisliğinde oldukça sık tercih edilen bir biyomalzemedir [121].

**Fibrin:** Plazma proteini olan fibrinojen, kanın pıhtılaşması sırasında fibrin iplikçiklerine dönüşür. Fibrinojen, fibrin iplikçiklerine trombin ve  $Ca^{2+}$  iyonu ile dönüşmektedir. Oluşan fibrinin dayanıklı olması, biyouyumluluğu ve elastikiyeti onların doku mühendisliğinde biyopolimer iskelet olarak kullanımlarına yol açmıştır [122].

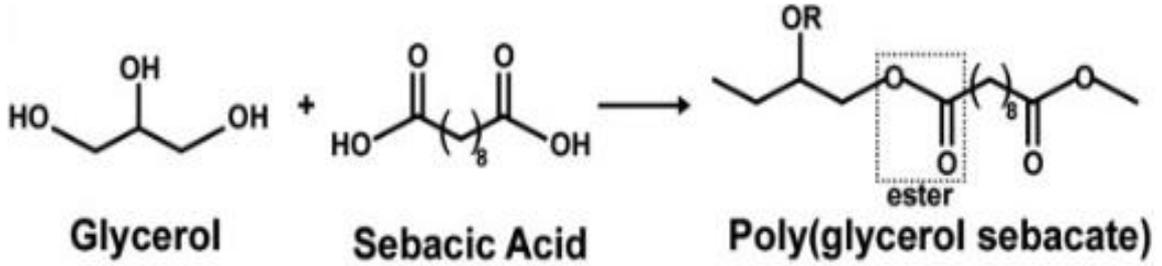
Kemik doku mühendisliğinde doğal polimerlerin yanı sıra maliyetlerinin düşük olması ve hazırlanmalarının daha kolay olması nedeniyle poli(laktik asit) (PLA), poli(L-laktik asit) (PLLA), poligliserik asit (PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(3-hidroksibütirik asit-ko-3-hidroksivalerik asit) (PHBV), polikaprolakton (PCL), polipropilen fumarat (PPF), polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler de kullanılmaktadır [123, 124].

### 2.5.2. Poli (Gliserol-Sebakat)

Poli (gliserol-sebakat), ilk kez 2002 yılında yumuşak doku mühendisliğinde biyobozunur bir polyeater olarak biyomedikal uygulamalarında yerini aldı. Yumuşak doku mühendisliği uygulamalarının yanı sıra sinir doku mühendisliğinde, damar greftinde, retinal transplantasyonda, kıkırdak ve kalp kası uygulamalarında da kardiyak yama olarak başarıyla kullanılan bir termoset elastomerdir [125, 126]. PGS, ekstrasellüler matriksin yapısında bulunan kollajen ve elastin bileşenlerinin mekanik davranışını taklit etmek üzere tasarlanmıştır [127]. Biyouyumlu ve biyobozunur özelliğinden dolayı biyomedikal uygulamalarda tercih edilir. PGS sentezi, ön polimerizasyon ve kütleme aşamalarından oluşmaktadır. PGS elastomeri, gliserolün ( $CH_2(OH)CH(OH)CH_2OH$ ) hidroksil grubu ve sebakik asidin ( $HOOC(CH_2)_8COOH$ ) karboksil grubunun katalizöre gerek olmadan, kondenzasyon polimerizasyonu ile sentezlenmektedir [128]. Polimerin elastomerik yapısı, hidroksil grubunun polimerin ana zincirine üç boyutlu olarak kovalent bağ ile bağlanmasıyla oluşmaktadır. Hidroksil gruplarının arasındaki hidrojen bağlarının etkileşim oranı, polimerin daha elastik veya daha kırılabilir özellik kazanmasında etkili

olmaktadır [11]. Ayrıca sebasik asit ve gliserol birlikte insan vücudunda herhangi bir metabolik aktiviteye maruz kaldığında sitotoksik etki yaratmamaktadır [129].

PGS elastomerinin mekanik dayanımı ve bozunma kinetiği özelliği ise isteğe bağlı olarak kürlenme sıcaklığının ve kürlenme zamanının kontrollü olarak ayarlanmasıyla sağlanmaktadır. PGS sentezi sırasında kürlenme zamanı ve sıcaklığın artmasıyla birlikte PGS kristallik özelliği azalmaktadır [130].



Şekil 2.7. PGS elastomeri sentezi [127].

Poli (gliserol-sebakat), kimyasal yapısında bulundurduğu karbon zincirine çapraz bağ ile bağlanmış olarak bulunan hidroksil grubu sayesinde hidrofilik özellik göstermektedir. Gerilme direnci ölçümlerinde diğer yumuşak elastomerler gibi lineer olmayan bir davranış sergiler ve gerilme direnci > 0.5MPa'dır. PGS materyalinin young modülü ise yaklaşık olarak 0.0250-1.2MPa civarındadır [11]. Bahsettiğimiz özelliklerinin yanı sıra çapraz bağlanarak ayarlanabilen mekanik özelliklere sahip olması, in vivo ve in vitro ortamda yüzey degradasyonu ile çözünmesi ve  $\beta$ -TCP ile kombine edilerek yönlendirilmiş kemik doku onarımını sağlaması, PGS'nin sert doku onarımında tercih edilmesinin en büyük sebebidir [126, 131].

Çalışmada PGS elastomerinin kemik greftleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve yapısı itibariyle  $\beta$ -TCP seramiğine benzerlik gösteren hidroksiapatit seramiğinin tercih edilmeyip,  $\beta$ -TCP seramiğinin tercih edilmesi, Ca/P oranının hidroksiapatitte yaklaşık 1.667,  $\beta$ -TCP'de ise bu oranın yaklaşık 1.5 civarı olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü Ca/P oranının azlığı biyo ortamda daha hızlı çözünmeyi ifade eder [132].

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Protokol Dizaynı**

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapılan bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu Başkanlığı'nın 18/09/2018 tarihli, 2018/09 toplantı sayılı ve 2018/50-02 numaralı kararı ile "Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının Çalışma, Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Hükümleri yönünden uygun bulunarak onaylanmıştır. Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (HÜBAP) tarafından 17747 proje numarası ile desteklenmiştir.

#### **3.2. Deney Hayvanları**

Çalışmada 30 adet, ağırlığı 350-500 gr arasında olan erkek Wistar-Albino türü sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, Hacettepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi ve beslenme ve bakımları da aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar çalışma süresince 20-24 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda barındırılmıştır. Cerrahi operasyon öncesi değerlendirmede deneye dahil edilen deneklerin hiçbirinde enfeksiyon, açık yara veya başka bir sağlık bozukluğu tespit edilmemiştir. Denekler cerrahi girişimden sonraki ilk 2 hafta ıslatılarak yumuşatılmış yem ve bisküvi ile beslenmiştir.

#### **3.3. Preoperatif Hazırlık ve Anestezi**

Cerrahi işlem öncesi deneklere 12 saat yiyecek kısıtlaması yapıldı ve denekler operasyona hazır hale getirildi. Sıçanların anestezisi Ketamin (Ketalar ®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) (90mg/kg) ve Ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) (10mg/kg) karışımı ile intraperitonel olarak sağlandı. Cerrahi işlem süresince deneklerin idrar ve dışkı çıkarması veya uyanması halinde ek doz olarak 10mg/kg ketamin ve 2 mg/kg ksilazin verilerek anestezinin devamı sağlanmıştır.

### **3.4. Çalışmada Kullanılan Materyaller**

Çalışmada kullanılan doku iskelesi poli(glisерol-sebakat) elastomeri ve beta-trikalsiyum fosfat partiküllerinden oluşmaktadır. Elastomer sentezi için kullanılan monomerler gliserol (>%99) ve sebasik asit (%99) olup her iki monomer de Sigma-Aldrich, Almanya'dan temin edilmiştir. Seramik partiküller ise BMT Calsis firmasının Suprabone isimli kemik grefti olup, ilgili firma tarafından hibe edilmiştir.

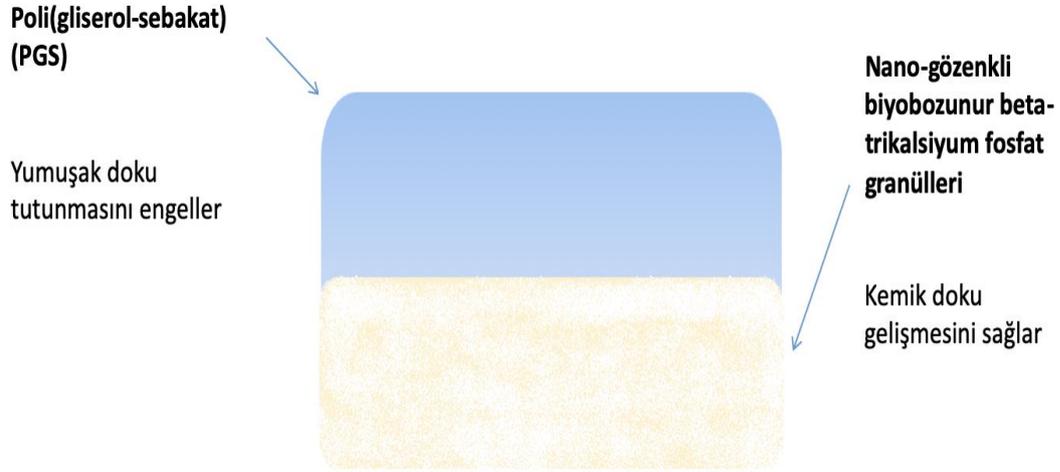
#### **3.4.1. Çift Katmanlı Poli (gliserol-sebakat)/TCP Doku İskelesinin Hazırlanması**

Poli(glisерol-sebakat) elastomerinin sentezinde eşmolar oranda tartılan gliserol ve sebasik asit öncelikle bir mikrodalga reaktör (WhiteWestingHouse, ABD) prepolimerizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon sırasında 1:1 mol oranında tartılan gliserol ve sebasik asit cam reaktör içerisine alındıktan sonra %30 oranında b-trikalsiyum fosfat partikülleri (200-500 µm) ilave edilmiştir. Reaktör 650 W güç ile aralıklarla 30'ar saniye boyunca çalıştırılmıştır. Bu şekilde gliserol-sebakat prepolimeri ve seramik partiküllerden oluşan iki katmanlı bir tabaka elde edilmiştir. Reaksiyonun ikinci aşaması bir vakum etüvü (Thermo Scientific, ABD) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ise elde edilen prepolimerin çapraz bağlanarak nihai elastomere dönüşmesi sağlanmıştır. İşlem tamamen fiziksel olup bir çapraz bağlama ajanı kullanılmamıştır. Karışım içerisine ilave edilen partiküller aşağıda kalırken, yüksek vakum altında oluşan elastomer de üst tabaka olarak oluşmaktadır. Özetle bu çift katmanlı yapının oluşmasını sağlayan temel mekanizma, çapraz bağlanma sırasında elastomerik fazın hareketinden, faz yoğunluklarının farkından ve uygulanan vakum farkından kaynaklanmaktadır [126]. Tüm reaksiyon boyunca herhangi bir katalizör kullanılmadığından, benzer şekilde elde edilen ürüne herhangi bir saflaştırma işlemi de yapılmamıştır. 10.5 saat boyunca yapılan vakum uygulamasının (maksimum 10 mBar) ardından elde edilen doku iskeleleri cam kaptan toplanmış, 7x4x3 mm boyutlarında parçalar halinde kesilmiş ve uygun Tyvek paketleme malzemelerine alınarak ağızları kapatılmıştır. Daha sonra 20 kGray'lik radyasyon dozu uygulanarak (Gamapak, Çorlu) steril edilmiş ve hayvan çalışmalarına kadar uygun koşullar altında ağızları açılmadan saklanmıştır.

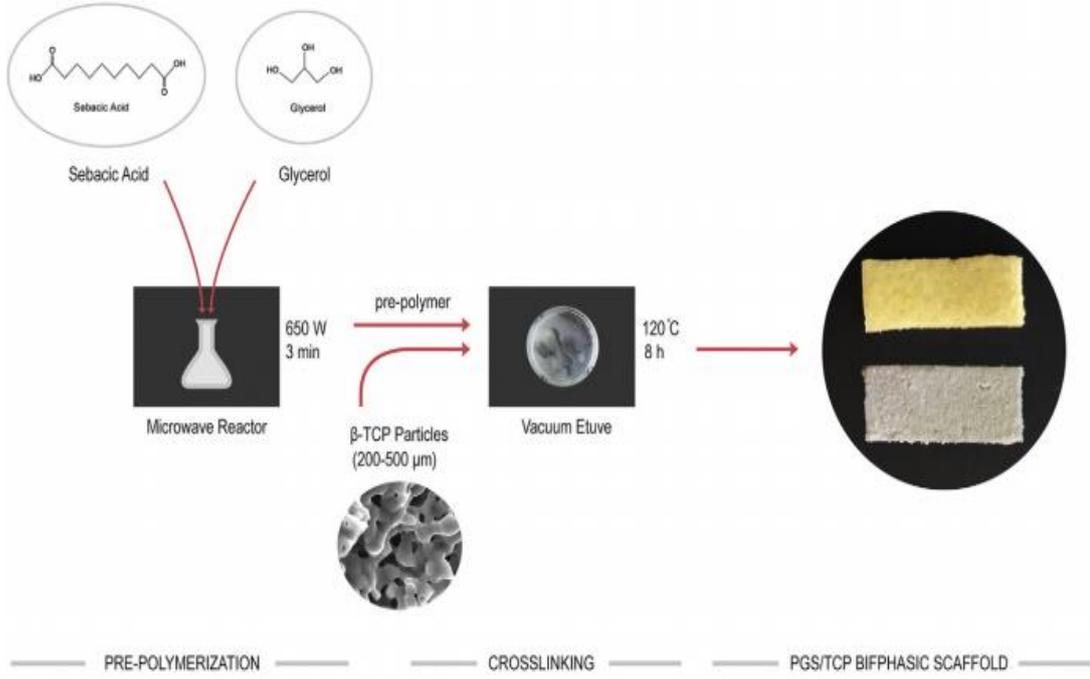
Elde edilen iki katmanlı doku iskelesinin elastomer tabakası blok halinde makroskobik olarak gözlenmiş olup, seramik fazdaki gözeneklilik değerinin araştırılması için malzeme

Bruker marka bir mikro-bilgisayarlı tomografi cihazında incelenmiş ve ilgili yazılım kullanılarak bir takım morfolojik özelliklerle hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonucunda toplam obje hacminin  $13.4 \text{ mm}^3$ ; toplam yüzey alanının  $201.64 \text{ mm}^2$  ve seramik tarafı toplam gözeneklilik değerinin ise %54.43 olduğu bulunmuştur.

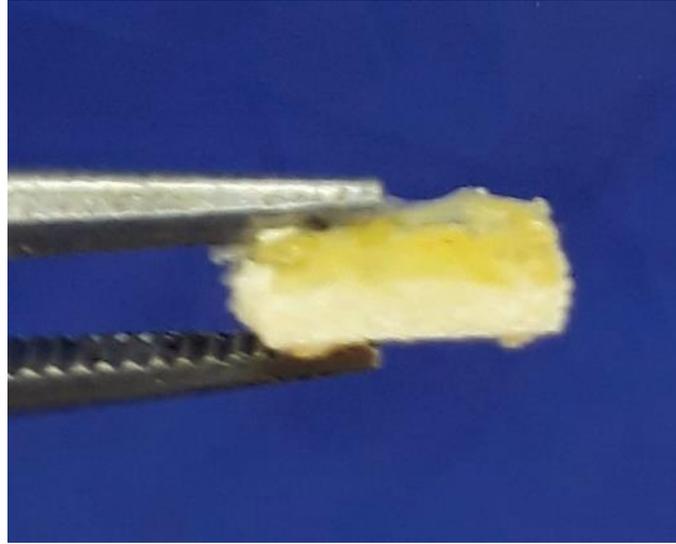
Hazırlanan doku iskelesinin temel amacı yumuşak doku penetrasyonunu önleyici bir tabaka ile implant materyali içerisine invazyonu önlemek ve eş zamanlı olarak seramik tabakası sayesinde uygun greft malzemesinin yollanabilmesinin sağlanmasıdır (Şekil 3.1). Elastomerik formundan ötürü hazırlanan doku iskelesinin uygulama bölgesinde kontüre uygun şekilde yerleştirilebilme gibi bir handling özeliği de getirmesi planlanmıştır.



**Şekil 3.1.** Hazırlanan çift katmanlı yapının şematik gösterimi.



**Şekil 3.2.** PGS/TCP materyalinin üretim şeması [126].



**Şekil 3.3.** 7x4x3 mm'lik PGS/ $\beta$ -TCP biyomateryalinin optik fotoğrafı.

### 3.5. Çalışma Grupları

Deneyde kullanılan sıçanlar her bir grupta 10 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Gruplardaki tüm sıçanların damağının sağ taraf alveoler kemiğini örten mukoza disseke edilerek alveol kemiği açığa çıkarıldı. Mikromotora bağlı döner testere yardımı ile 7x4x3 mm boyutlarında kemik defekti oluşturuldu.

**Birinci grup, defekt grubu (negatif kontrol grubu):** Bu grupta bulunan deneklerin her birinin alveoler bölgelerinde 7x4x3 mm'lik kritik boyutlu defektler oluşturuldu ve tedavi edici herhangi bir uygulama yapılmaksızın insizyon-mukoza 5/0 ipek ile suture ile kapatıldı.

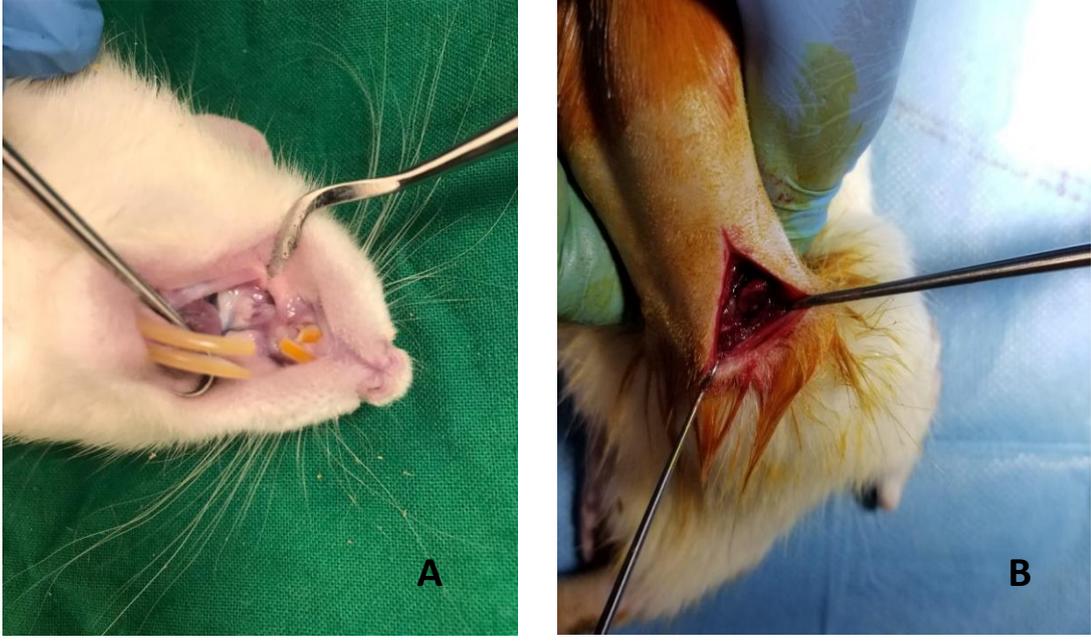
**İkinci grup, otogreft grubu (pozitif kontrol grubu):** Bu gruptaki deneklerin her birinin alveoler bölgelerinde 7x4x3 mm'lik kritik boyutlu defektler oluşturuldu. Aynı deneklerin iliyak bölgesi traşlanıp sterilize edildi, hazırlanan defekt ile aynı boyutta 7x4x3 mm'lik iliyak kemik otogrefti alınarak defekt bölgesine yerleştirildi ve insizyon yine 5/0 ipek ile suture edildi.

**Üçüncü grup, (-çift katmanlı-PGS/TCP grubu) (deney grubu):** Bu gruptaki deneklerin her birinin alveoler kemik bölgesinde 7x4x3 mm'lik kritik boyutlu kemik defektleri oluşturulduktan sonra defekt bölgesine yine aynı boyutta hazırlanmış olan çift katmanlı doku iskeleleri (internal kısım TCP, eksternal kısım PGS olacak şekilde) yerleştirildi ve insizyon yine 5/0 ipek ile suture edildi.

Gruplardaki deneklerin her biri morfolojik ve histolojik incelemeler için 6. Ayın sonunda karbondioksit narkozu ile sakrifiye edildi. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra, damak yarığının olduğu bölgeden alınan üst cene örnekleri %10'luk paraformaldehit içinde sabitlendi. Buradan mikro-BT görüntülerinin alınması HUNITEK mikro-BT ünitesine taşındı.

### **3.6. Cerrahi İşlem**

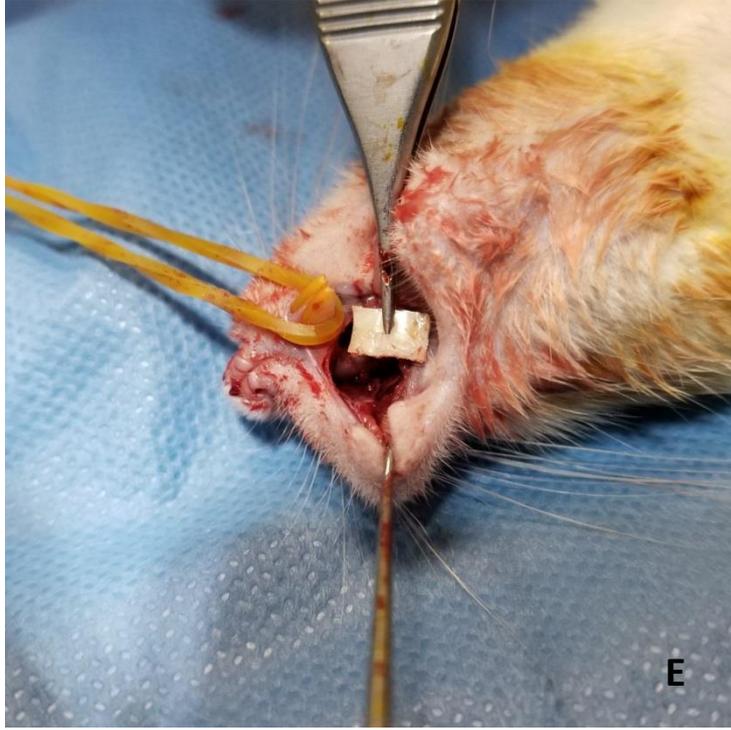
Denekler anestezi altında supin pozisyona getirilerek ağızları rekraktör yardımıyla açıldı. Povidon ile lokal temizlik yapıp, molar diş ve öndeki kesici dişler arası 1 cm'lik bölge mukozası bistüri ile tam kat kesildi. Sonrasında dentoalveolar periost kaldırılıp, alveoler kemiğe ulaşıldı. İnce uçlu matkap ile alveoler kemik (nazal kemiğe kadar) kesilerek standart 7x4x3 mm'lik kemik defekti oluşturuldu. Hemostazı takiben her gruptaki denekler için bu işlemler gerçekleştirilmiş olup, operasyon sonunda insizyon, 5/0 veyril sutureler ile kapatıldı. Bu cerrahi işlemler tüm deney gruplarında standart olarak gerçekleştirildi.



**Şekil 3.4.** A) Üst çenede defekt oluşturulan alveol bölgesi. B) Defekt oluşturulan damağın alveoler bölgesine yerleştirilen otogreftin alındığı iliyak kemik bölgesi.



**Şekil 3.5.** C) Alveoler kemikten alınan 7x4x3 mm'lik kemik defekti. D) Defekt bölgesine yerleştirilecek kemik otogrefti.



Şekil 3.6. E) Defekt bölgesine yerleştirilen PGS/TCP biyomalzemesi.



Şekil 3.7. F) Defekt bölgesine yerleştirilen otogreft.

### **3.7. Post Operatif Evre**

Operasyon sonrası tüm denekler kafeslerine alınarak cerrahi işlem sonrası oluşabilecek ağrı ve acılara tedavi amacıyla içme sularına 2mg/ml parasetamol eklendi. Sıçanlar post operatif dönemde kesi hatlarının iyileşmesi ve açılmaması amacıyla 3 hafta bisküvi ezmesiyle beslenilmiş olup, sonraki süreçte beslenmelerinde standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanılarak durumları takip edildi.

### **3.8. Radyomorfometrik Çalışmalar**

Denekler 6. ayın sonunda CO<sub>2</sub> anestezisi altında sakrifiye edilerek üst çeneleri blok olarak çıkarılıp, formaldehite yerleştirildi. Alveoler kemik örnekleri defekt bölgesindeki kemikleşme miktarının mikrotomografi ile tayini için taranmak üzere Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (HUNİTEK) teslim edilmiştir. Radyograflar ön kesici dişlerin labiyal yüzeyinden zigomatik arka kadar olan bölümünün mikro tomografi cihazı (Skyscan 1272; Bruker, Belgium) ile taranmasından elde edilmiştir. Elde edilen radyograflar üzerinden Nrecon software (Skyscan 1272; Belgium) programı iki boyutlu, 21 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Elde edilen 2 boyutlu kesitler CTAn (version 1.17.7.2, Bruker micro-CT) medikal analiz programına aktarılmıştır. Ölçülen parametreler; kemik yoğunluğu (BV), doku yoğunluğu (TV), trabeküler volüm (TV), Trabeküler kalınlık (TbTh), BV/TV, BS/BV ve TbN şeklindedir.

### **3.9. Histomorfometrik Çalışmalar**

Örnekler %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisinde oda sıcaklığında fikse edildikten sonra mikrotomografiye gönderilmiştir. Dokular, mikrotomografi çalışmaları sonunda De Castro çözeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) kontrollü olarak dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra örnekler distile su ile yıkanıp sabit vakumlu otomatik doku takip cihazında rutin histolojik takip basamakları izlenerek parafin bloklar oluşturulmuştur. Kızaklı mikrotomda 3-5 mikrometre kalınlığındaki seri kesitlerde Hematoksilen Eozin ve Gomori Trikrom boyama teknikleri uygulanmıştır. Trikrom tekniğiyle olgun, kompakt kemiğin kırmızı, yeni kemiğin yeşil ve hücre sitoplazmalarının da eflatun boyandığı yüksek kontrastlı görüntüler elde edilmiştir. Kesitler ışık mikroskopunda (DM6B, Leica, Almanya) görüntülenip kamera

ataşmanı (DFC7000T, Leica, Almanya) yardımıyla yüksek çözünürlüklü mikrograflar elde edilmiştir. Mikrograflarda alveol defektindeki kemikleşme, dijital ortamda kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Bunun için defekt alanındaki yeni kemik miktarı ve toplam defekt alanı hesaplandıktan sonra defekt alanındaki yüzde yeni kemik oranı görüntü analiz yazılımı (LAS X, Leica, Almanya) kullanılarak kantitatif olarak ölçülmüştür [28, 36]. Ölçümler, bütün gruplardaki örneklerde defekt alanının ön kesici dişlere yakın kısmından başlayarak oluşan yeni kemik bölgesi merkeze alınarak gerçekleştirilmiştir.

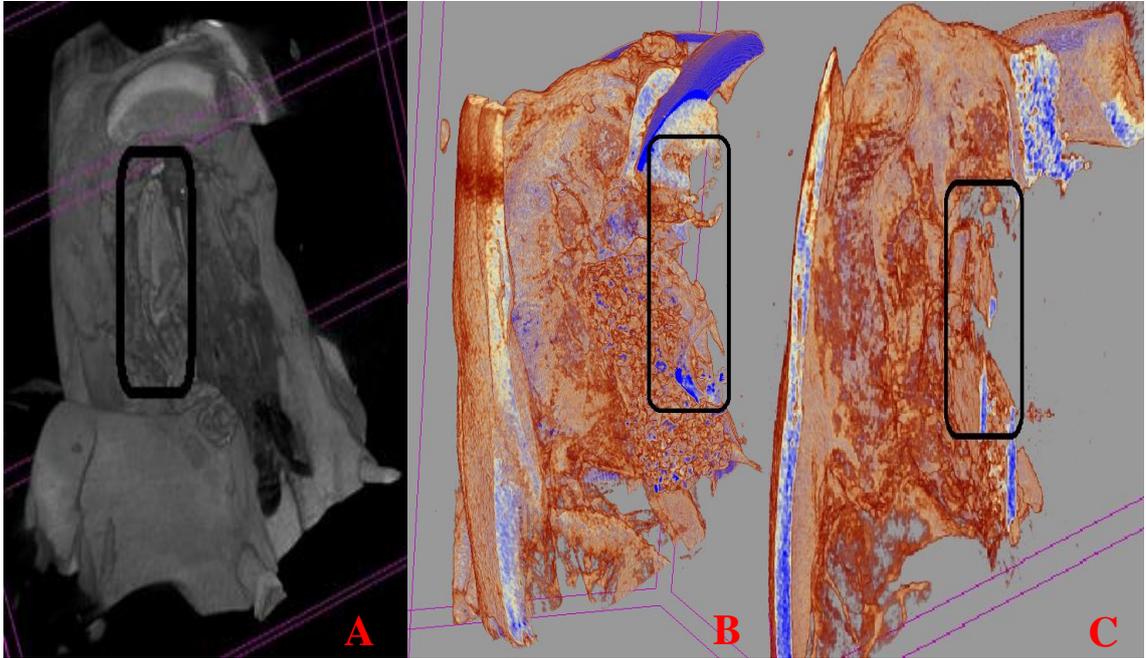
### **3.10. İstatistiksel Çalışmalar**

İncelemelerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS versiyon 25 kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin parametrik olup olmadığı Shapiro-wilk testi kullanılarak incelenmiştir. Analiz sonuçları, parametrik değişkenler için ortalama ve standart sapmalar kullanılarak elde edilmiştir. Yeni kemik miktarı gruplar arasında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Levene testi sonucunda varyansların homojen olmadığı gözlemlendiğinden tek yönlü varyans analizi için Welch ANOVA testi, gruplar arası ikili karşılaştırmalarda ise Post-hoc testi olarak Tamhane testi kullanılmıştır.  $P < 0.05$  olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

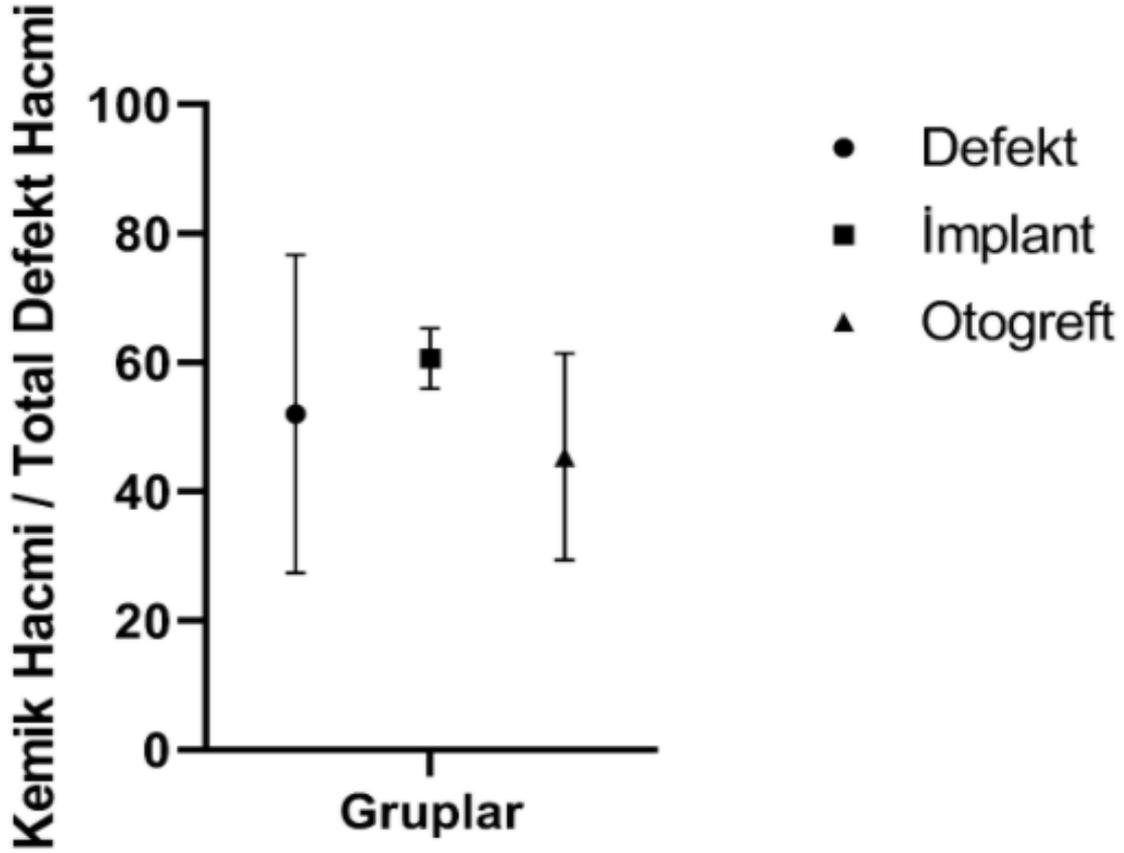
## 4. BULGULAR

### 4.1. Radyomorfometrik Değerlendirme

Tomografik incelemelerde amaç, defekt oluşturulan bölgede oluşan yeni kemiğin hacim olarak tespit edilmesiydi. İnceleme sonunda elde edilen tomografik radyograflardan her gruba ait birer radyograf örneği temsilen Şekil 4.1 A,B,C’de verilmiştir. Yeni oluşan kemik alanının tayini için deneklerin üst çenesi, santral dişlerin arasından geçen bir hattan simetrik olarak iki kısma bölünüp, çenenin operasyon gören sol segmentindeki defekt hacmi ve içindeki kemik doku hacmi hesaplanmış, sonrasında bu değerler oranlanarak istatistiksel analizleri yapılmıştır. İmplantın yerleştirildiği deney grubu, defektin boş bırakıldığı negatif ve kemik otogrefti yerleştirilen pozitif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında defekt içindeki yeni kemik miktarının, toplam defekt hacmine oranının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.2). Otogreft grubunun ise boş defekt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı iyilik sağlamadığı gözlemlenmiştir ( $p>0.05$ ) (Welch ANOVA, Post-hoc Tamhane testleri).



**Şekil 4.1.** A) Defekt grubuna ait tomografik radyograf. B) PGS/ $\beta$ -TCP doku iskelesinin bulunduğu gruba ait tomografik radyograf. C) Otogreft grubuna ait tomografik radyograf.

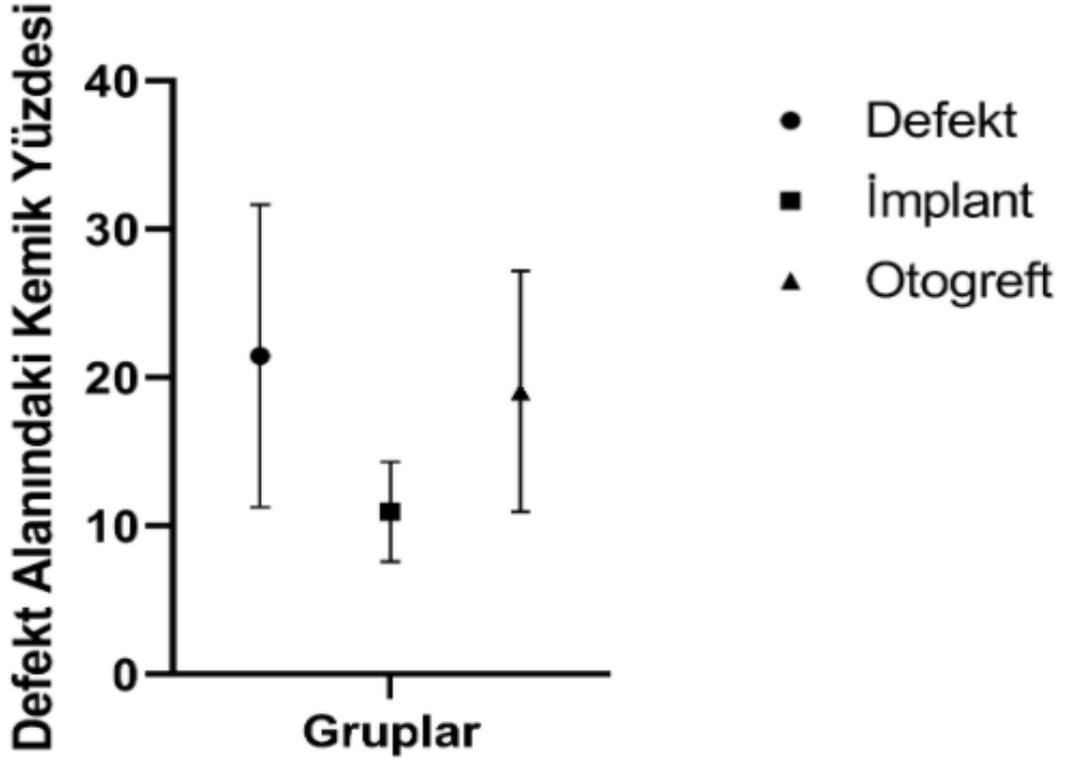


Şekil 4.2. Mikrotomografide hesaplanan kemik hacmi / total defekt hacmi ölçümlerine ait tanımsal istatistikler, ortalama ve standart sapma olarak hata çubukları grafiğinde gösterilmiştir.

#### 4.2. Histomorfometrik Değerlendirme

Histomorfometrik değerlendirmede, deney ve kontrol gruplarına ait tüm örneklerde ön kesici dişlerin arka kısmında bulunan gingival mukozanın alveol defekti bölgesine doğru ilerlediği izlenmiştir (Şekil 4.4 A-C). Tüm gruplarda kritik büyüklükteki defekt alanının değişen oranlarda vaskülarize, fibröz bağ dokusu ve yer yer yeni kemik spikülleri ile doldurulduğu, incelenen zaman diliminde (6. Ay) hiçbir grupta kemikleşmenin yüzde elliye ulaşmadığı dikkati çekmiştir (Grafik 4.2). İmplant uygulanan deney grubu defektin boş bırakıldığı negatif ve otogreft uygulanan pozitif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında defekt içindeki yeni kemik miktarının toplam defekt alanına oranının istatistiksel anlamlı farklılık göstermediği saptanmıştır (Grafik 4.3). Diğer yandan altın standart olarak kabul edilen otogreft grubunun boş defekt grubuna göre anlamlı iyilik sağlamadığı dikkati çekmiştir ( $p > 0.05$ ) (Welch ANOVA, Post-hoc Tamhane testleri).

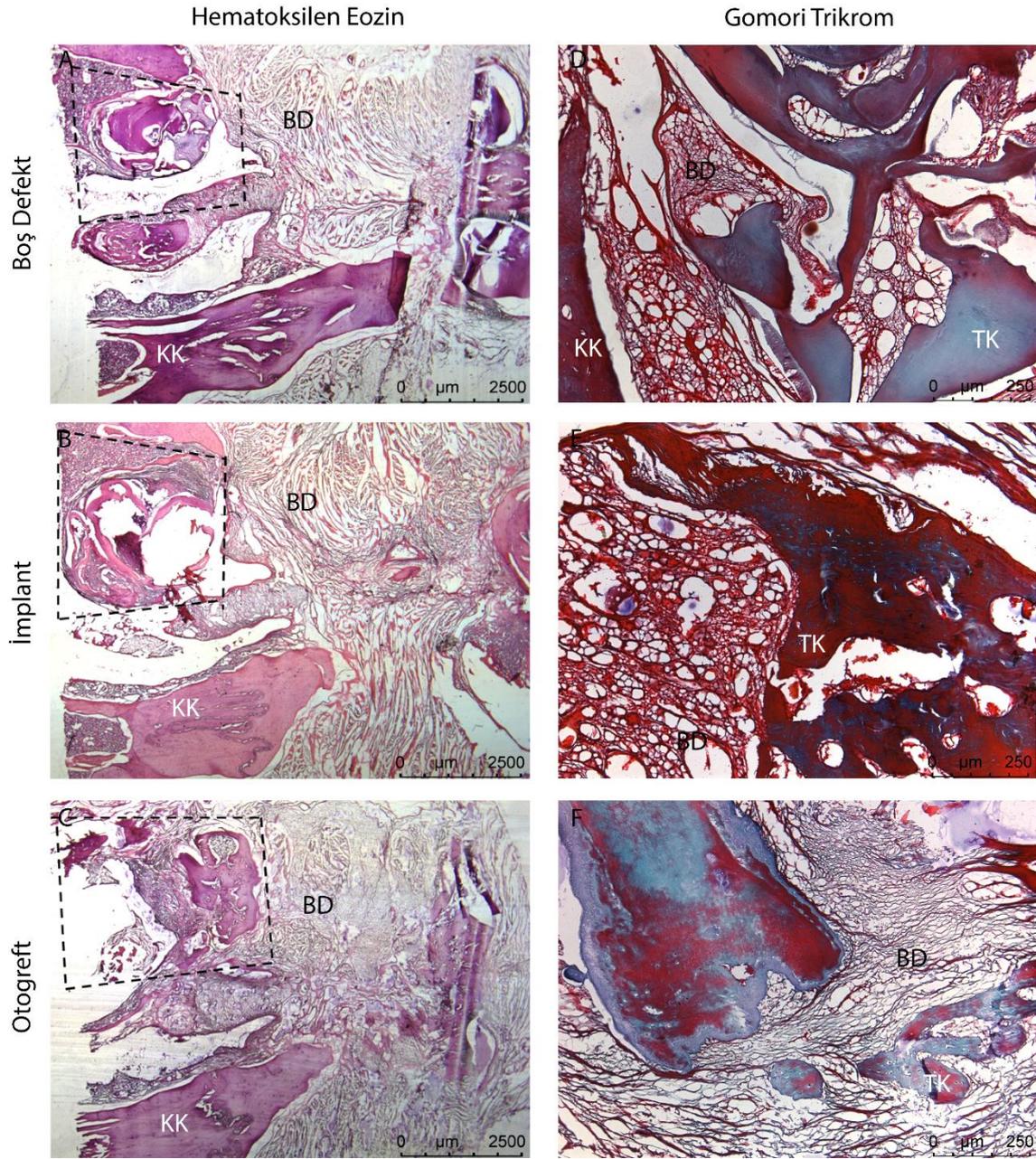
İmplant uygulanan gruplarda biyomalzemenin zamana bağlı degrade olduğu ve yerini büyük ölçüde yeni kemik dokusu değil de gingivaya ait yumuşak dokuya bıraktığı görülmüştür.



Şekil 4.3. Histomorfometrik olarak hesaplanan defekt alanındaki yeni kemik yüzdesi ölçümlerine ait tanımsal istatistikler, ortalama ve standart sapma olarak hata çubukları grafiğinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Grupların istatistiksel ortalama ve standart sapma değerleri.

		Ortalama Değer	Standart Sapma
Histoloji Kemik Yüzdesi Analizi	Defekt	21,4405	10,20123
	İmplant	10,9448	3,37080
	Otogreft	19,0633	8,11776
Mikro-BT Kemik Yüzdesi Analizi	Defekt	52,0428	24,68983
	İmplant	60,5471	5,01681
	Otogreft	51,1602	12,97799



**Şekil 4.4.** Sol kolonda küçük ve sağ kolonda büyük büyütmede negatif kontrol (A, D), pozitif kontrol (C, F) grupları ile implant uygulanan (B, E) gruplara ait alveoler defekt görüntüleri görülmektedir. Tüm örneklerde defekt alanında vaskülarize, kollagen liflerden zengin bağ dokusu (BD) ve eşlik eden yeni kemik spikülleri (K) izlenmektedir. D-F’de olgun kemik kırmızı, yeni kemik yeşil renkte görülmektedir. A-C: Hematoksilen Eozin x12,5. D-F: Gomori Trikrom x100.

## 5. TARTIŞMA

Hayvan çalışmalarında alveoler defekt modeli ilk kez 1950'lerde Harvold tarafından Rhesus maymunlarında kullanılmıştır. Oluşturulan defektin boyutu 2mm olarak belirlenmiştir. O zamandan günümüze kadar alveoler defekt çalışmalarında kedi, köpek, sıçan, tavşan ve keçi gibi birçok türde deney hayvanı kullanılmıştır [133]. Ancak nceki çalışmalarda belirlenen defekt boyutu sınırlı sayıda denekler ile yapılmaktaydı. Kritik boyutlu defekt modeli ise ilk kez Warren ve ark. tarafından yapılmıştır. 7x4x1.5 mm boyutunda olan defektte Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanılmıştır [134]. 2008 yılına geldiğinde ise Phuong D.Nguyen ve ark. ilk kez rat modelinde alveoler yarık geliştirip, defekt boyutunu 7x4x3 mm olarak belirlemişlerdir [134]. Çalışmamızda bu model kullanılmıştır.

Tam damak yarıklarının onarımı, cerrahi onarım teknikleri ile yapılmaktadır. Amaç, damağın bütünlüğünü sağlamak, konuşmayı ve normal beslenmeyi inşa etmektir. Bu onarım işleminin diğer basamağı alveol kemiğindeki eksikliğin (yarığın) giderilmesidir. Böylece st çenedeki kemik devamlılığı sağlanmış, dişlerin normal ekseninde ve yerinde çıkması olanaklı hale getirilmiş, yenilen yiyeceklerin burundan gelmesi nlenmiş olur. Hali hazırda bu onarım işlemi, bebeğin kalçasındaki leğen (iliyak) kemikten alınan kemik grefti ile yapılmaktadır. Bu işlem için bebek hastanın kalça kemiği açılmakta oradan kemik grefti alınmakta aynı seansta alveol kemiğinin olmadığı defektli alana konularak çevresindeki gingiva dokusu ve lokal flepler ile örtülmektedir. Ototogreft içerisinde hacim oluşturan kemik dokusu onun içinde de canlı osteoblastlar mevcuttur. Bu kemik grefti ameliyat sonrasındaki süreçte önce difüzyon ile beslenir sonrasında ise vaskülarize olarak canlılığını sürdürüp, defekti doldurur. Böylece her iki alveoler uçların birleşmesiyle çenenin bütünlüğü sağlanmış olur.

Alveoler defektin tedavisinde hali hazırda denenen malzemelerde otogreftlerin yanı sıra allogreftler ve sentetik materyaller de bulunmaktadır. Büyüme faktörü, kök hücre kullanımı gibi biyolojik ürünler ve biyomühendislik ürünleri de denenmektedir [135]. Skafold olarak biyoyumlu, biyobozunur poliglikolik asit, polilaktik asit ve kollajen sıklıkla tercih edilmektedir [136].

Altın standart olarak belirlenen otogreft uygulamaları ile alınan kemik greftlerinin alıcı yatakta tutmaması, enfeksiyon gelişmesi, greftin alındığı yerde ağrı, hematoma, skar

oluşması, ameliyat süresinin uzaması gibi sorunlar yaşanmaktadır. Bu çalışmada amaç, kemik grefti gibi davranacak, kemik yapımını uyaracak veya kemik doku öncüsü gibi davranarak kemikleşmeyi sağlayacak bir biyomalzeme geliştirmektir. Geliştirilen PGS/ $\beta$ -TCP doku iskelesinin, (sıçan alveoler defekt modelinde) altın standart olarak kabul edilen kemik otogrefti yerine kullanılabilirliği araştırılmıştır. Böylece bebek hastadan kemik grefti almadan başarılı şekilde ve bu risklerden kaçınarak alveol kemik defektini onarabilmek sorgulanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız biyomalzemenin yapısındaki TCP osteokondüktif özelliğe sahiptir. PGS ise osteokondüktif olmasının yanı sıra elastik, dayanıklı ve mikro çevreye uygun davranış gösterme yeteneğine sahiptir [137].

Poli(gliserol-sabakat) elastomeri aynı zamanda polilaktik asit, poliglikolik asit ve polikaprolakton gibi polimerler ile kıyaslandığında PGS'nin, yapılan western-blot araştırmalarında fokal adezyon kinazının yani hücrenin, hücre iskeleti yoluyla ekstraselüler matriksle bağlantı kurma potansiyelinin daha yüksek olduğu görülmüştür [137].

PGS elastomerinin biyouyumluluğu 2005 yılında periferik sinir kondüit çalışmalarında, 2006 yılında damar doku mühendisliği çalışmalarında, 2008 yılında miyokard dokusu çalışmalarında, 2009 yılında ilaç taşıyıcı sistemlerde, 2010 yılında kırık dokuda ve 2017 yılında ise SH Zaky ve ark. tarafından kemik dokusunda in vitro ve in vivo ortamlarda kanıtlanmıştır [125, 137-141].

Alveoler bölge, ortada bikortikal kemik ve dışında gingivadan oluşmaktadır. Bikortikal kemiğin ortasında ise kansellöz kemik bulunmaktadır. Kansellöz kemiğe gömülü diş pulparları bebek büyüdükçe dışarıya doğru ilerleyerek dişlerin gelişimine ve çıkmasına yol açmaktadır. Bu iki katman özelliği nedeniyle çalışmamızda diğer çalışmalarda kullanılan PGS/ $\beta$ -TCP karışımından farklı olarak iki katman halindeki şekli tercih edilmiştir. Bir katman kemik oluşumunu uyarıp, kemik öncüllerinin göçüne yardım ederken diğer katmanın (PGS katmanı) ise örtücü yumuşak dokunun gelişimine katkı sağlaması ön görülmüştür. PGS/TCP ile yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde bu iki malzemenin karışım olarak kullanıldığı yine bu araştırmacıların ifadelerine göre PGS'nin degradasyonu sırasında ortamdaki pH'nın asidikleştiği, TCP ile karıştırıldığında ise bu

pH değişiminin tamponlandığı ifade edilmektedir. Ancak ayrı iki katman halinde kullanıldığında da bu pH değişikliğinin TCP katmanı ile nötrale edilebileceği tarafımızca ön görölmüş ve bu araştırmamızda da kullanılmıştır.

PGS/TCP biyomalzemesinin çift katlı olmasının diğer bir avantajı ise eklem yüzeyleri gibi bir yüzü kırıldak diğer yüzü kemik oluşumunu indükleyebileceği ön görüsüne dayanmaktadır.

Bu çalışmada elde ettiğimiz verileri birlikte değerlendirdiğimizde; radyografik ve histolojik analizlerde doku iskelesi olarak geliştirilen PGS/ $\beta$ -TCP biyomalzemesinin implant grubundaki bulgular, negatif kontrol grubu (sıçanda kritik boyutlu alveol kemik defekti grubu) ve otogreft grubu ile kıyaslandığında gruplar arasında radyolojik ve histolojik olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Altın standart olarak kabul edilen kemik otogreft grubunun (pozitif kontrol grubu) radyolojik ve histomorfometrik sonuçları negatif kontrol grubununki ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görölmemiştir ( $p>0.05$ ). Bu sonuçlar ile PGS/TCP grubunda defektin kemik dokusundan çok gingiva (yumuşak doku) yapımını uyardığı, yeni kemik dokusunun yapımını ise oransal olarak daha az uyardığı görölmektedir. Üniversitemizin HUNİTEK biriminde çekilen mikro-BT görüntülerinin 21  $\mu$  kalınlıkta olması görüntüler üzerinden daha detaylı değerlendirme yapma şansını engellemiştir. İki katmanlı hibrit skafoldun degradasyon süresi, hızı ve ortam pH'sındaki değişimlere yönelik in vitro çalışma, planımızda olmadığından elimizde kesin veri bulunmamaktadır. PGS/TCP kombinasyonunun skafold çalışmaları sonucunda degradasyon sırasında gelişen asidik pH'nın tamponlanamadığı, bu nedenle kemik iyileşmesinin arzu edilenden geride olduğu hipotez olarak söylenebilir. Alveol kemik defekti onarımında hem eksik kemiğin yerine konulması hem de kemiğin üstünü örtecek sağlam yumuşak doku örtüsüne ihtiyaç vardır. Bu iskele kemik ihtiyacını karşılamaktan çok yumuşak doku desteğinin oluşumunda ve sağlanmasında etkili olmuştur.

Her ne kadar PGS elastomerleri, poli(L-laktik asit) (PLLA) gibi yığın degradasyon mekanizmasına sahip olmasa da içeriğindeki asit tabanlı monomerlerin degradasyon sonucunda ortam pH'sını düşürdüğü bilinmektedir. Buna ilaveten yapıya konulmuş kalsiyum fosfat seramiklerinin PLLA gibi yığın degradasyonuna uğrayan polimerlere (özellikle vida gibi uygulamalarda) ilave edilmesinin pH'yı dengelemede etkin bir çözüm

olduğu da bilinmektedir. Bu tez çalışması için hazırlanan hibrit malzemede de kemik oluşumuna yardımcı olmanın yanı sıra degradasyon sonucu oluşacak asidik ortamı tamponlayacak şekilde davranması beklenen bir seramik faz bulunmaktadır. Sonuç olarak yüzey erozyonu ile oluşan asidik pH'nın ortamdan uzaklaştırılması ya da tamponlanması malzemenin yapısındaki TCP'ye bağlı seramik fazın pH'yı tamponlaması beklenmiştir. Ancak skafolddaki seramik ve elastomer fazların birbirinden ayrı olması pH düşmesine yeterince engel olamadığı, sonuçta kemik doku iyileşmesinde beklenen olumlu etkinin sağlanamadığı kanaatine götürmüştür. Ph üzerindeki etkilerin araştırılması için elde edilen doku iskelelerinin hücre kültür ortamı içerisinde 24 saat bekletilmesini takiben pH değerinin  $6.5 \pm 0.13$ 'e düştüğünün gözlemlenmiş olması da bu ön görümüzü desteklemektedir.

Denekler beslenme sırasında çiğneme ve ısırma hareketi yapmaktadır. Bu sırada kesilen ve dikilen bölge travmaya maruz kalmakta zamanla dikişler açılabilen bir başka deyişle kemik iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Cerrahi işlem yapılan bölge deneğin ağız florası ile kontamine olmakta, mikro çevreyi etkileyebilmektedir. İnsanda da durum böyledir.

Kemik otogreftlerinin yapısında canlı osteoblastlar, osteoblastların sentezlediği kemik ekstrasellüler matriksi ve bu matrikse bağlı büyüme faktörleri vardır. Mikro çevrenin uygunluğu güvence altına alındığında bu greftler en iyi kemik iyileşmesi ve rekonstrüksiyonunu sağlamaktadırlar. Bundan dolayı altın standart olarak kabul edilirler. Çalışmamızdaki otogreft grubunun değerlerinin beklenenden düşük olması çiğneme sırasında otogreftlerin hareket etmesine ve ağız florasıyla kontamine olmasına bağlanmıştır. Diğer yandan çiğneme sırasında otogreftler defekt alanının dışına, alveolün ön veya arka kenarlarına doğru yer değiştirebilmektedir. Bu da defektin, otogrefti rekonstrükte etmediği ya da eridiği yorumuna yol açmaktadır.

Çalışmamızda doku iskelesi olarak geliştirilen iki katlı PGS/ $\beta$ -TCP biyomalzemesi, doku mühendisliği ilkelerinden hücre, sitokin, ekstrasellüler matriks bileşenlerinden yalnızca ECM'yi taklit eden PGS elastomerini ve osteokondüktif özellikli TCP seramiğini içermektedir. İçinde canlı hücre ve sitokin bulunmamaktadır. Sonuç olarak PGS/TCP biyomalzemesinin yeni kemik oluşumunda etkili olduğu gözlemlenmesine rağmen biyomalzemenin sitokinlerle kombine edilerek osteoindüktif özelliğinin artırılmasının

daha iyi sonuca götüreceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca daha büyük deney hayvanlarındaki defekt modelinde yeniden geliştirilecek bu biyomalzemenin kullanılması daha uygun olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] M. Hoşnuter, E. Aktunç, E. Kargı, M. Ünalacak, O. Babuççu, N. Demircan, A. Işıkdemir, Yarık damak dudak aile rehberi, SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (2002) 9-13.
- [2] S.M. Gökçe, S. Görgülü, O. Bengi, Tek taraflı dudak damak yarıklı hastalarda nazo-alveolar şekillendirme, Gülhane Medical Journal, 54 (2012) 160-4.
- [3] D. Keçik, A. Enacar, Effects of nasopalveolar molding therapy on nasal and alveolar morphology in unilateral cleft lip and palate, Journal Of Craniofacial Surgery, 20 (2009) 2075-80.
- [4] B. Kamiloğlu, Dudak Damak Yarıkları ve Preoperatif Tedavi Yaklaşımları. [http://docs.neu.edu.tr/staff/beste.kamiloglu/PUBLICATION\\_11.pdf](http://docs.neu.edu.tr/staff/beste.kamiloglu/PUBLICATION_11.pdf) (Erişim tarihi: 8 Temmuz 2020).
- [5] D.F. Öztopalan, Kemik greftleri ve veteriner ortopedide kullanımı, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10 (2017) 76-82.
- [6] K. Halıcioğlu, G.K. Koçal, Damak yarıklı hastalarda alveoler kemik greftlemesi, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 26 (2016) 153-68.
- [7] A. Şimşek, G. Çakmak, E. Cila, Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler, Totbid Dergisi, 3 (2004) 1-11.
- [8] J.O. Hollinger, J.C. Kleinschmidt, The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials, The Journal Of Craniofacial Surgery, 1 (1990) 60-8.
- [9] R.A. Delgado-Ruiz, J.L. Calvo-Guirado, G.E. Romanos, Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using arrive guidelines, Clinical Oral Implants Research, 26 (2015) 915-30.
- [10] S.C. Kılıç, İmplant Cerrahisinde Trikalsiyum Fosfat İçerikli Greft Materyaliyle Yapılan Sinüs Augmentasyonu Uygulamalarında Trombositten Zengin Plazma'nin Etkinliğinin Klinik, Radyolojik ve Histomorfometrik Olarak Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2014.
- [11] R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore, A.R. Boccaccini, Synthesis, properties and biomedical applications of poly (glycerol sebacate) (Pgs): A Review, Progress In Polymer Science, 37 (2012) 1051-78.
- [12] G. Tunçbilek, F. Özgür, S. Balcı, 1229 yarık dudak ve damak hastasında görülen ek malformasyon ve sendromlar, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 47 (2004) 172-76.
- [13] O.G.D.S. Filho, A.L. Ramos, R.C.C. Abdo, The influence of unilateral cleft lip and palate on maxillary dental arch morphology, The Angle Orthodontist, 62 (1992) 283-90.
- [14] R.H. Ivy, The influence of race on the incidence of certain congenital anomalies, notably cleft lip-cleft palate, Plastic And Reconstructive Surgery, 30 (1962) 581-5.

- [15] B.R. Rollnick, S. Pruzansky, Genetic services at a center for craniofacial anomalies, *Cleft Palate J*, 18 (1981) 304-13.
- [16] P.A. Mossey, J. Little, R.G. Munger, M.J. Dixon, W.C. Shaw, Cleft lip and palate, *The Lancet*, 374 (2009) 1773-85.
- [17] F.K. Wong, U. Hägg, An update on the aetiology of orofacial clefts, *Hong Kong Medical Journal*, 10 (2004) 331-6.
- [18] K. Ulucan, Yarık Damak-Dudak Vakalarında Fenotip Genotip İlişkisinin İncelenmesi, *Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2009.
- [19] H. Friede, B. Lennartsson, Forward traction of the maxilla in cleft lip and palate patients, *The European Journal Of Orthodontics*, 3 (1981) 21-39.
- [20] Z.G. Gökmen, Sıçan Modelinde, Hyaluronik Asidin Yarık Damak Operasyonu Sonrası Maksiller Kemik Gelişimi Üzerine Etkisi, *Tıpta Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi*, 2012.
- [21] Ş. Kavaloğlu Çıldır, S. Çalışkan, N. Sandallı, Dudak-damak yarıklarında etiyoloji, embriyoloji, klinik bulgular ve tedavi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 11 (2010) 103-8.
- [22] M.C. Johnston, Embryogenesis Of Cleft Lip And Palate, *Plastic Surgery*, 1990.
- [23] K.L. Moore, *The Developing Human*, Wb Saunders, (1988) 197-213
- [24] D.A. Kernahan, R.B. Stark, A new classification for cleft lip and cleft palate, *Plastic And Reconstructive Surgery*, 22 (1958) 435-41.
- [25] A. Vieira, Unraveling human cleft lip and palate research, *Journal Of Dental Research*, 87 (2008) 119-25.
- [26] K. L. Moore, T.V.N. Persaud, *Klinik Yönleri ile İnsan Biyolojisi 6. Baskıdan Çeviri Ed. H. Dalçık, M. Yıldırım, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul*, 2002.
- [27] E. Aydınli, Tek Taraflı Dudak-Damak Yarıklı Olgularda Ortopedik Tedavi ve Sekonder Kemik Grefti Uygulamasının Çene-Diş-Yüz Kompleksi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir*, 2008.
- [28] A. Alıcı, Hayvan Modellerinde “Tgf-B3” ve “Bmp-2” Salın Doku İskeleleri ile Damak Yarığı Onarımı, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
- [29] A.S. Greenwald, S.D. Boden, V.M. Goldberg, Y. Khan, C.T. Laurencin, R.N. Rosier, Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications, *JBJS*, 83 (2001) 98-103.
- [30] F. Hernandez-Alfaro, E. Garcia, G. Corchero, C. Arranz, Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site, *International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants*, 20 (2005) 777-83.
- [31] M. Ayan, Sistemik Olarak Verilen Zoledronik Asidin (Zometa®), Titanyum Dental İmplantların Osteointegrasyon Düzeylerine Etkisi, *Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2008.
- [32] B. Ersu, İmplant diş hekimliğinde kullanılan ağız içi otojen kemik greftleri, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 10 (2007) 135-40.

- [33] A. Kökden, M. Türker, Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller, Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2 (1999) 134-40.
- [34] T.W. Bauer, G.F. Muschler, Bone graft materials: an overview of the basic science, Clinical Orthopaedics And Related Research®, 371 (2000) 10-27.
- [35] N. Şener, H. Özger, Kemik greftleri ve kemik bankaları, Acta Orthop Traumatol Turc 29 (1995) 335-8.
- [36] D.Ö. Ekin, Damak Yarıklarının İn Situ Doku Mühendisliği ile Onarımı: Alveolar Yarık Hayvan Modeli Oluşturulması ve Farklı Rejimlerde Biyobozunur Doku İskeleleri ile Onarımı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2014.
- [37] S.A. Wolfe, S. Berkowitz, The use of cranial bone grafts in the closure of alveolar and anterior palatal clefts, Plastic And Reconstructive Surgery, 72 (1983) 659-71.
- [38] B.C. Harsha, T.A. Turvey, S.K. Powers, Use of autogenous cranial bone grafts in maxillofacial surgery: a preliminary report, Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery, 44 (1986) 11-5.
- [39] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. Planell, Biomaterials in orthopaedics, Journal Of The Royal Society Interface, 5 (2008) 1137-58.
- [40] P.Y. Huri, N. Hasırcı, V. Hasırcı, Kemik doku mühendisliği, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 19 (2010) 206-19.
- [41] B. Silverman, K. Buring, The Bone Induction Principle, Clin Orthop, 53 (1967) 243-83.
- [42] M.R. Urist, E. Dawson, Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (aaa) bone, Clinical Orthopaedics And Related Research, (1981) 97-113.
- [43] U. İnan, E. Göktürk, Allogreftler, Totbid Dergisi, 10 (2011) 168-73.
- [44] U.S. Ersoy, Alveolar Yarık Tedavisinde Kemik Greftiyle Birlikte Demineralize Kemik Allogrefti Uygulamasının Volumetrik Analiz Yöntemiyle Değerlendirilmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2011.
- [45] Y.M. Dinçel, Bone Graft Types, Bone Grafting: Recent Advances With Special References To Cranio-Maxillofacial Surgery, Intechopen, 2018.
- [46] J. Alexander, Bone Grafting, The veterinary clinics of north america. Small Animal Practice, 17 (1987) 811-9.
- [47] O. Perihan, Osseointegrasyon ve kemik rejenerasyonunda kemik doku mühendisliğinin yeri, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 26 (2016) 87-95.
- [48] L.J. Peterson, Principles of management and prevention of odontogenic infections, Contemporary Oral And Maxillofacial Surgery, (1998) 392-417.
- [49] F. Korkusuz, E. Tomin, D.N. Yetkinler, M. Timuçin, A. Öztürk, P. Korkusuz, Yapay kemik dokusu, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, (2011) 134-42.
- [50] U. Topaloğlu, M.A. Ketani, B.G. Saruhan, Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 10 (2017) 62-71.

- [51] B. İnsal, İ. Pişkin, Kemik Dokusunun Fizyolojisi, Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 28 (2017) 28-32.
- [52] S.C. Marks Jr, P.R. Odgren, Structure and development of the skeleton, principles of bone biology, Elsevier (2002) 3-15.
- [53] A. Erkoçak, Genel Histoloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1983.
- [54] Ö.E. Tunçay, Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- [55] S.M. Ott, New aspects of normal bone biology, The Spectrum Of Mineral And Bone Disorders In Chronic Kidney Disease, 2 (2010) 15-29.
- [56] P. Jayakumar, L. Di Silvio, Osteoblasts in bone tissue engineering, proceedings of the institution of mechanical engineers, Part H: Journal Of Engineering In Medicine, 224 (2010) 1415-40.
- [57] C.J. Junqueira, LC. Kelley Ro, Basic Histology, Barış Kitabevi, İstanbul, 1998.
- [58] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, Acta Biomaterialia, 9 (2013) 7591-621.
- [59] D. Sommerfeldt, C. Rubin, Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton, European Spine Journal, 10 (2001) 86-95.
- [60] S.K. Sel, H. Kasap, Osteoporoz ve ilişkili genler: vdr, esr ve colla1, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20 (2011) 246-69.
- [61] G. Dietz, P. Bartholmes, Calcium Hydroxide And Bone Regeneration: Odontological Aspects Of Induced Osteogenesis In Experiment And Clinical Practice, Isar-Post, Dr.-Und Verlag-Gmbh, 1998.
- [62] S. Perumal, O. Antipova, J.P. Orgel, Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis, Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 105 (2008) 2824-9.
- [63] H.M. Erdoğan D, Görgün M, Ilgaz C, Genel Histoloji, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 1999.
- [64] M. Sadat-Shojai, Preparation of hydroxyapatite nanoparticles: comparison between hydrothermal and solvo-treatment processes and colloidal stability of produced nanoparticles in a dilute experimental dental adhesive, Journal Of The Iranian Chemical Society, 6 (2009) 386-92.
- [65] C.J. Junqueira Lc, Basic Histology Text&Atlas, International Yayıncılık, Amerika, 2013.
- [66] N. Soydan, Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, İstanbul, 1992.
- [67] Ö. AYTEKİN, Temel Histoloji, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 2014.
- [68] A.T. Eryılmaz, Demineralize Kemik Matriksinin Farklı Doku Planlarında Histolojik Davranışının Değerlendirilmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2008.
- [69] Ö.A. Sağlam M, Özer, A. Aştı, RN, Genel Histoloji, Yorum Yayınevi, Ankara, 2008.

- [70] J. Lindhe, T. Karring, N.P. Lang, *Periodontologia Clinica E Implantologia Odontologica/Clinical Periodontology And Implant Dentistry*, Ed. Médica Panamericana, **2009**.
- [71] Y. Fujikawa, J.M. Quinn, A. Sabokbar, J.O. Mcgee, N.A. Athanasou, The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction, *Endocrinology*, 137 (1996) 4058-60.
- [72] L. Uslucan, *Kalsiyum Trigliserit Kemik Sementinin ve Kitosanin Kemik Dokusu İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2013**.
- [73] P.A. Downey, M.I. Siegel, *Bone Biology and the clinical implications for osteoporosis*, *Physical Therapy*, 86 (2006) 77-91.
- [74] U. Kini, B. Nandeesh, *Physiology Of Bone Formation, Remodeling, And Metabolism, Radionuclide And Hybrid Bone Imaging*, (2012) 29-57.
- [75] R.D. Frandson, W.L. Wilke, A.D. Fails, *Anatomy And Physiology Of Farm Animals*, John Wiley & Sons, **2009**.
- [76] A.V. D'antoni, *Gray's Anatomy, The Anatomical Basis Of Clinical Practice, Forty- First Edition*, By Susan Standring, Editor- In- Chief, Elsevier Limited, **2016**.
- [77] G. Bernard, *Healing and repair of osseous defects*, *Dental Clinics Of North America*, 35 (1991) 469-77.
- [78] J.R. Lieberman, G.E. Friedlaender, *Bone Regeneration And Repair: Biology And Clinical Applications*, **2005**.
- [79] S. Tanrikulu, E. Gönen, *Kırık iyileşmesi*, *Totbid Dergisi*, 16 (2017) 455-75.
- [80] T.J. Cho, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, *Differential temporal expression of members of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily during murine fracture healing*, *Journal Of Bone And Mineral Research*, 17 (2002) 513-20.
- [81] S.S. Kılıçoğlu, *Mikroskobi düzeyinde kırık iyileşmesi*, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 55 (2002) 143-50.
- [82] R.M. Kliegman, R.E. Behrman, H.B. Jenson, B.M. Stanton, *Nelson Textbook Of Pediatrics E-Book*, Elsevier Health Sciences, **2007**.
- [83] M. Berberoğlu, *Paratiroid Gland, Kalsiyum, Fosfor ve Vitamin D Metabolizması ve Hastalıkları*, *Pediyatrik Endokrinoloji. Pediyatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları*, Ankara, **2003**.
- [84] B. Durmaz, *Biyokimyasal Göstergeler*, Gökçe-Kutsal Y, Ed: *Osteoporozda Kemik Kalitesi*. Güneş Tıp Kitapevi, Ankara, **2004**.
- [85] M. Seibel, *Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects*, *Osteoporosis International*, 11 (2000) 18-29.
- [86] G. Attila, S. Matyar, *Plazma enzimlerinin tanısal değerleri*, *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1 (2002) 73-82.
- [87] E. Kumchev, V. Stanchev, M. Yaneva, A. Botushanova, R. Dimitrova, D. Dimitrakov, *Assessment of serum osteocalcine level in pre-dialysis patients with chronic renal failure*, *Folia Medica*, 42 (2000) 14-8.

- [88] P. Magnusson, A. Häger, L. Larsson, Serum osteocalcin and bone and liver alkaline phosphatase isoforms in healthy children and adolescents, *Pediatric Research*, 38 (1995) 955-61.
- [89] P.V. Hauschka, J.B. Lian, D. Cole, C.M. Gundberg, Osteocalcin and matrix gla protein: vitamin k-dependent proteins in bone, *Physiological Reviews*, 69 (1989) 990-1047.
- [90] E. Puchacz, J.B. Lian, G.S. Stein, J. Wozney, K. Huebner, C. Croce, chromosomal localization of the human osteocalcin gene, *Endocrinology*, 124 (1989) 2648-50.
- [91] E. Kajantie, L. Dunkel, J. Risteli, M. Pohjavuori, S. Andersson, Markers Of type i and iii collagen turnover as indicators of growth velocity in very low birth weight infants, *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (2001) 4299-306.
- [92] M. Gümüşderelioğlu, Doku mühendisliği ve ürünleri, *Bilim ve Teknik*, 516 (2010) 70-5.
- [93] R. Langer, J. Vacanti, *Tissue Engineering. Tissue Engineering: The Union Of Biology And Engineering*, 98 (1993) 920-6.
- [94] Z. Karahaliloğlu, Doku mühendisliğinde nanoteknolojik yaklaşımlar, *Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi*, (2011) 31-9.
- [95] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126 (2006) 663-76.
- [96] P.C. Baer, H. Geiger, *Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, And Heterogeneity*, *Stem Cells International*, 2012.
- [97] H. Orbay, M. Tobita, H. Mizuno, *Mesenchymal Stem Cells Isolated From Adipose And Other Tissues: Basic Biological Properties And Clinical Applications*, *Stem Cells International*, 2012.
- [98] J.R. Nefussi, G. Brami, D. Modrowski, M. Obcuf, N. Forest, Sequential Expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro, *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, 45 (1997) 493-503.
- [99] E. Ergin, Y. Ekici, F.B. Ataç, Doku mühendisliği ve uygulama alanları, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 38 (2018) 70-8.
- [100] E. Scheller, P. Krebsbach, D. Kohn, Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation, *Journal Of Oral Rehabilitation*, 36 (2009) 368-89.
- [101] W.R. Moore, S.E. Graves, G.I. Bain, Synthetic bone graft substitutes, *Anz Journal Of Surgery*, 71 (2001) 354-61.
- [102] L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, *Science*, 295 (2002) 1014-17.
- [103] E.M. Younger, M.W. Chapman, Morbidity at bone graft donor sites, *J Orthop Trauma*, 3 (1989) 192-5.

- [104] E. Nyström, J. Ahlqvist, P.E. Legrell, K.-E. Kahnberg, Bone graft remodelling and implant success rate in the treatment of the severely resorbed maxilla: a 5-year longitudinal study, *International Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, 31 (2002) 158-64.
- [105] X. Liu, P.X. Ma, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals Of Biomedical Engineering*, 32 (2004) 477-86.
- [106] R.J. Fonseca, R. Walker, N. Betts, H. Barber, *Oral And Maxillofacial Trauma (Vol 1)*, Philadelphia: Ed. Saunders Co, 1991.
- [107] J.E. Fleming, C.N. Cornell, G.F. Muschler, Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering, *Orthopedic Clinics*, 31 (2000) 357-74.
- [108] E. Kömürcü, M.E. İnanmaz, I. Cengiz, A. Burak, K.Ç. Köse, Kemik yerine geçen biyomateryaller 2. kısım: hayvansal ve sentetik greftler, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 13 (2011) 46-52.
- [109] C.N. Cornell, Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts, *Orthopedic Clinics*, 30 (1999) 591-8.
- [110] M. Oruç, Y. Kankaya, K. Gürsoy, K. Yıldız, U. Koçer, D. Kankaya, G. Koca, S. Uysal, A. Kılınç, Kemik defektlerinin onarımında otojen kemik grefti, demineralize kemik matriksi (dkm),  $\beta$  trikalsiyum fosfat ( $\beta$  tkf) ve dkm+  $\beta$  tkf kombinasyonu kullanımının kıyaslanması, *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk J Plast Surg)*, 24 (2016) 197-206.
- [111] I. Türkyılmaz, *Implant Dentistry: The Most Promising Discipline Of Dentistry, Bod-Books On Demand*, 2011.
- [112] H.H. Horch, R. Sader, C. Pautke, A. Neff, H. Deppe, A. Kolk, Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws, *International Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, 35 (2006) 708-13.
- [113] M.I. Sabir, X. Xu, L. Li, A Review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *Journal Of Materials Science*, 44 (2009) 5713-24.
- [114] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress In Polymer Science*, 32 (2007) 762-98.
- [115] K. Bostan, T. Aldemir, A. Aydın, Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi, *Türk Mikrobiyal Cemiyeti Dergisi*, 37 (2007) 118-27.
- [116] B. Seal, T. Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Materials Science And Engineering: R: Reports*, 34 (2001) 147-230.
- [117] F. Tırnaksız, Y. Kaymak, Hyalüronik asit, *Türkiye Klinikleri Journal Of Dermatology*, 18 (2008) 9-16.
- [118] Z. Aktaş, Sert Doku Onarımına Yönelik Makrogözenekli Kollajen-Hidroksiapatit Matriks Yapıların Geliştirilmesi ve Hücre Kültüründe Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- [119] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri, K. Rubini, Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin, *Biomaterials*, 23 (2002) 4827-32.
- [120] A. Ward, The Physical Properties Of Gelatin Solutions And Gels, *British Journal Of Applied Physics*, 5 (1954) 85-90.

- [121] Y. Wang, H.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials*, 27 (2006) 6064-82.
- [122] P.A. Janmey, J.P. Winer, J.W. Weisel, Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications, *Journal Of The Royal Society Interface*, 6 (2008) 1-10.
- [123] H. Kenar, G.T. Köse, V. Hasırcı, Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films, *Biomaterials*, 27 (2006) 885-95.
- [124] P. Yılıgör, R.A. Sousa, R.L. Reis, N. Hasırcı, V. Hasırcı, 3d Plotted Pcl Scaffolds For Stem Cell Based Bone Tissue Engineering, *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library, 2008.
- [125] D. Motlagh, J. Yang, K.Y. Lui, A.R. Webb, G.A. Ameer, Hemocompatibility evaluation of poly (glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering, *Biomaterials*, 27 (2006) 4315-24.
- [126] A. Tevlek, P. Hosseinian, C. Ögütçü, M. Türk, H.M. Aydın, Bi-Layered constructs of poly (glycerol-sebacate)- $\beta$ -tricalcium phosphate for bone-soft tissue interface applications, *Materials Science And Engineering: C*, 72 (2017) 316-24.
- [127] I. Pomerantseva, N. Krebs, A. Hart, C.M. Neville, A.Y. Huang, C.A. Sundback, Degradation Behavior Of Poly (Glycerol Sebacate), *Journal Of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal Of The Society For Biomaterials, The Japanese Society For Biomaterials, And The Australian Society For Biomaterials And The Korean Society For Biomaterials*, 91 (2009) 1038-47.
- [128] H.M. Aydın, K. Salimi, Z. Rzayev, E. Pişkin, Microwave-assisted rapid synthesis of poly (glycerol-sebacate) elastomers, *Biomaterials Science*, 1 (2013) 503-9.
- [129] D.G. Barrett, M.N. Yousaf, Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism, *Molecules*, 14 (2009) 4022-50.
- [130] A. Tevlek, H.M. Aydın, Poly (Glycerol-Sebacate) Elastomer A Mini Review, *Ortho Surg Open Access (Osoa. 000507)*, 1 (2017) 1-4.
- [131] D. Lin, K. Yang, W. Tang, Y. Liu, Y. Yuan, C. Liu, A Poly (Glycerol Sebacate)-coated mesoporous bioactive glass scaffold with adjustable mechanical strength, degradation rate, controlled-release and cell behavior for bone tissue engineering, *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 131 (2015) 1-11.
- [132] R.Z. Legeros, J.P. Legeros, Calcium Phosphate Bioceramics: Past, Present And Future, *Key Engineering Materials*, Trans Tech Publ, 2003.
- [133] G. Chierici, E.P. Harvold, W.J. Dawson, Morphologic adaptations secondary to the production of experimental cleft palate in primates, *Cleft Palate J*, 7 (1970) 59-67.
- [134] P.D. Nguyen, C.D. Lin, A.C. Allori, J.L. Ricci, P.B. Saadeh, S.M. Warren, Establishment of a critical-sized alveolar defect in the rat: a model for human gingivoperiosteoplasty, *Plastic And Reconstructive Surgery*, 123 (2009) 817-25.
- [135] P.X. Ma, R. Zhang, G. Xiao, R. Franceschi, engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly ( $\alpha$ - hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds, *journal of biomedical materials research: An Official Journal Of The Society For Biomaterials And The Japanese Society For Biomaterials*, 54 (2001) 284-93.

- [136] K.S. Koh, J.W. Choi, E.J. Park, T.S. Oh, Bone regeneration using silk hydroxyapatite hybrid composite in a rat alveolar defect model, *International Journal Of Medical Sciences*, 15 (2018) 59-68.
- [137] S. Zaky, K. Lee, J. Gao, A. Jensen, K. Verdelis, Y. Wang, A. Almarza, C. Sfeir, Poly (Glycerol sebacate) elastomer supports bone regeneration by its mechanical properties being closer to osteoid tissue rather than to mature bone, *Acta Biomaterialia*, 54 (2017) 95-106.
- [138] C.A. Sundback, J.Y. Shyu, Y. Wang, W.C. Faquin, R.S. Langer, J.P. Vacanti, T.A. Hadlock, Biocompatibility analysis of poly (glycerol sebacate) as a nerve guide material, *Biomaterials*, 26 (2005) 5454-64.
- [139] Q. Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M.Q. Tran, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Boccaccini, Characterisation of a soft elastomer poly (glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue, *Biomaterials*, 29 (2008) 47-57.
- [140] Z. J. Sun, C. Chen, M.Z. Sun, C.H. Ai, X.L. Lu, Y.F. Zheng, B.F. Yang, D.L. Dong, The application of poly (glycerol–sebacate) as biodegradable drug carrier, *Biomaterials*, 30 (2009) 5209-14.
- [141] J.M. Kemppainen, S.J. Hollister, Tailoring The mechanical properties of 3d-designed poly (glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications, *journal of biomedical materials research part a: an official journal of the society for biomaterials*, The Japanese Society For Biomaterials, And The Australian Society For Biomaterials And The Korean Society For Biomaterials, 94 (2010) 9-18.