

**PERİODONTAL REJENERASYON İÇİN KİTOSAN/nano-
HİDROKSİAPATİT/PCL BARIYER MEMBRANLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF CHITOSAN/nano-
HYDROXYAPATITE/PCL BARRIER MEMBRANES FOR
PERIODONTAL REGENERATION**

ELİF SUNAL

Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2015

ELİF SUNAL'ın hazırladığı “**Periodontal Rejenerasyon için Kitosan/nano-Hidroksiapatit/PCL Bariyer Membranların Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nuray YILDIZ

Başkan

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye

Prof. Dr. Selma MUTLU

Üye

Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canum Aileme;

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/01/2015

ELİF SUNAL

ÖZET

PERİODONTAL REJENERASYON İÇİN KİTOSAN/nano- HİDROKSİAPATİT/PCL BARIYER MEMBRANLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Elif SUNAL

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Ocak 2015, 125 sayfa

Bu çalışma 114M132 numaralı TÜBİTAK Projesi ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı desteği ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı mevcutlarından daha etkin özelliklere sahip yeni bir bariyer membranın geliştirilmesi ve geliştirilen membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyelinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile gözenekli kitosan membranlar üretilmiştir. Bu amaçla, 150-250 µm boyut aralığındaki silika partikülleri kitosan çözeltisine farklı oranlarda eklenmiş ve yeterli gözenekliliğe sahip bir membran elde edebilmek için çözeltiye eklenen silika miktarı optimize edilmiştir. NaOH ortamında farklı uygulama süreleri ile denemeler yapılarak silika partiküllerini membran yapısından tamamen uzaklaştırmak için gerekli süre belirlenmiştir. Sonuç olarak homojen ve içsel bağlantılı gözenekleri olan, ortalama 169.7±78.7 µm gözenek çapına sahip, gliserin muamelesi öncesindeki ve sonrasındaki kalınlığı sırasıyla; 408.6±42.2 µm ve 519.3±23.4 µm olan kitosan membranlar üretilmiştir.

Çalışmanın sonraki aşamasında, hazırlanan kitosan membranın mekanik ve biyoaktiflik özelliklerini iyileştirmek için membranın gözenekli yüzeyi mikrodalga ışımasının etkisiyle sentetik vücut sıvısı (10xSBF) kullanılarak hidroksiapatit (HA) ile kaplanmıştır. Yüzeydeki ve gözeneklerin içerisindeki HA varlığı taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi ile gösterilmiş ve membran yüzeyindeki kemik benzeri HA kaplamaya ait ortalama Ca/P (w/w)

oranı EDX analizi ile 2.54 ± 0.59 olarak hesaplanmıştır. HA kaplı membran yüzeyi kemik morfojenik proteini-6 (BMP-6) ile zenginleştirilerek, BMP-6'nın periodontal rejenerasyondaki etkinliği incelenmiştir. Membranın gözeneksiz yüzeyi epitel hücre göçünü engellemek ve yumuşak dokudaki inflamasyonu ortadan kaldırmak amacıyla elektroğirme yönteminden faydalanarak optimize edilen koşullarda ağırlıkça %5, 10 ve 15 metronidazol (Mz) içeren poli-ε-kaprolakton (PCL) fiberler ile kaplanmıştır. Ortalama çapları 1 µm olan fiberlerin membran yüzeyinden kalkmadıkları ve Mz salımını gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak 750.1 ± 21.9 µm kalınlığında, şişme oranı 3.43 ± 0.13 , kuru ve ıslak haldeki çekme dayanımları sırasıyla; 0.948 ± 0.123 MPa ve 0.418 ± 0.053 MPa olan, lizozim ortamında 28 gün boyunca ağırlığında herhangi bir değişim gözlenmeyen bir bariyer membran (HA/Ch/PCL) üretilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında geliştirilen membranın sert doku ile temas edecek olan gözenekli yüzeyinin biyoaktivitesi MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı ile *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Hücre canlılığı ve üremesi PrestoBlue analizi, hücrelerin morfolojik özellikleri ise SEM ile değerlendirilmiştir. Hücre farklılaşması alkalen fosfataz (ALP) boyama ile belirlenmiştir. Hücrelerin osteojenik farklılaşma belirteçleri olan kollajen I, RunX2, osteokalsin ve osteopontin gen ifadeleri RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar membran yüzeyinin hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği yönündedir. Membranın yumuşak doku ile temas edecek olan yüzeyi ise *in vitro* koşullarda Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) hücre hattı ile kültüre edilmiştir. Hücre canlılığı ve üremesi PrestoBlue analizi, hücrelerin morfolojik özellikleri ise SEM ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar membran yüzeyinin epitel hücre göçünü engellediği yönündedir.

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında; biyobozunur, kolay bir şekilde manipüle edilebilen, kemik rejenerasyonunu destekleyen, epitel hücre göçünü engelleyen ve inflamasyonu ortadan kaldıracak bir bariyer membran geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, kitosan, hidroksiapatit, BMP-6, elektroğirme, metronidazol.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CHITOSAN/nano-HYDROXYAPATITE/PCL BARRIER MEMBRANES FOR PERIODONTAL REGENERATION

Elif SUNAL

Master of Science, Chemical Engineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

January 2015, 125 pages

This thesis was prepared with the supports of 114M132 TÜBİTAK project and TÜBİTAK 2210-C Primary Subject Scholarship for National Master Program. The aim of the present study is to develop a new barrier membrane that is more effective than currently used membranes and investigate its potential for periodontal regeneration.

In the first stage of the study, porous chitosan membranes were produced by solvent casting-particle leaching method. For this purpose; silica particles having the size of 150-250 μm were added into the chitosan solution with different ratios. In order to obtain a membrane having sufficient porosity, the amount of silica added to chitosan solution and also silica leaching period were optimized. Consequently, the chitosan membranes were found to have homogenous and interconnected porous structure with the average pore size of $169.7 \pm 78.7 \mu\text{m}$. The thickness of the produced membranes increased from $408.6 \pm 42.2 \mu\text{m}$ to $519.3 \pm 23.4 \mu\text{m}$ as due to the glycerine treatment.

In order to enhance the mechanical and bioactive properties of the membranes, the porous surface of membrane was coated with hydroxyapatite (HA) through the application of microwawe radiation by using concentrated simulated body fluid (10xSBF). The presence of HA on the surface and within the pores was designated through scanning electron microscopy (SEM) and the average Ca/P (w/w) ratio referring to HA coating was calculated by means of EDX analysis as 2.54 ± 0.59 . The HA coated membrane was also enriched with bone morphogenetic protein-6 (BMP-6). In order to inhibit epithelium cell migration and to eliminate inflammation in soft tissue nonporous surface of the membrane was coated in optimised conditions with poly- ϵ -caprolactone (PCL) electrospun fibers having, 5, 10, 15 %

(w/w) antibacterial agent, metronidazole (Mz). The fibers having the diameters of approx. 1 μm were strongly attached to the membrane surface and performed Mz release. The result membrane including HA coating and PCL fiber coating (HA/Ch/PCL) was detected to have the thickness of $750.1 \pm 21.9 \mu\text{m}$, swelling ratio of 3.43 ± 0.13 , dry and wet tensile strength of $0.948 \pm 0.123 \text{ MPa}$ and $0.418 \pm 0.053 \text{ MPa}$, respectively.

In the last stage of this study, the bioactivity of HA coated surface of membrane having contact with hard tissue, was investigated by MC3T3-E1 preosteoblastic cell line *in vitro* conditions. The cell viability and proliferation were evaluated by PrestoBlue analysis and the morphological examination was evaluated with SEM. Differentiation of cells was determined with alkaline phosphatase (ALP) staining. The osteogenic differentiation indicators like collagen I, RunX2, osteocalcin and osteopontin gene expressions were determined through RT-PCR (real time polymerase chain reaction). The results indicates that the membrane surface supports adhesion, proliferation and differentiation of the cells. The other surface of the membrane having contact with soft tissue was cultured with Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) cell line *in vitro* conditions. The results of Presto Blue analysis and SEM demonstrate that, the membrane surface inhibits epithelial cell migration.

In conclusion, in this thesis a novel barrier membrane having periodontal regeneration potential was developed with the following properties: biodegradable, easily manipulated, supporting bone regeneration, inhibiting epithelial cell migration and enabling to eliminate inflammation.

Keywords: Guided tissue regeneration, chitosan, hydroxyapatite, BMP-6, electrospinning, metronidazole.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, tez çalışmamın yönlendirilmesi ve yürütülmesinde her türlü desteği ve imkanı sağlayan, hoşgörüsünü ve bana olan güvenini eksik etmeyen, her zaman öğretici ve yol gösterici olan, ufkumu genişleten, ilminden faydalandığım, bilim insanı olarak aynı zamanda insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşdereliolu**'na verdiği emeklerden dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca 114M132 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK**'a ve 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı çerçevesinde maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen **Tuğrul Tolga Demirtaş**'a,

Birlikte çalışmaktan ve vakit geçirmekten büyük mutluluk duyduğum çok değerli arkadaşlarım **İnci Shikhaliyeva**'ya, **Sahar Davarpanah**'a, **Derya Kalelioğlu**'na, **Meryem Sümeyye Akdemir**'e, **Bedriye Topal**'a ve **Aysu Arslan**'a,

Çekinmeden yardım isteyebileceğim, **Ar. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş**'e, **Ar. Gör. Merve Çapkın Yurtsever**'e, **Ar. Gör. Damla Çetin Altındal**'a, **Anıl Sera Çakmak**'a, **Ar. Gör. Soner Çakmak**'a, **Özge Ekin Tunçay**'a, **Gökçe Kaynak**'a, **Farzin Sana**'ya, **Gülseren Irmak**'a ve **Murat Şimşek**'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her anımda yanımda olan ve hayatımın her anında dostluklarına ihtiyaç duyacağım canım arkadaşşımlarım **Betül Bingöl**'e ve **Ar. Gör. İlkay Koçer**'e,

Tanıdığım ilk günden itibaren desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, hayattaki en büyük şansım **Abdullah Tunger**'e,

En sıkıntılı anlarımda varlığıyla yüzümü güldüren, içimi tarifi olmayan bir sevgi ile dolduran, bir gün bile görmeden yapamadığım, hayatımın neşesi, teyzesinin mis kokulu birtanecik yeğeni **Berk Bayraktar**'a, her zaman en büyük destekcim, yol göstericim olan, hayattaki duruşunu, zekasını ve becerisini örnek aldığım, benim için dünyada eşi benzeri olmayan, diğer yanım birtanecik canım ablam **Esra Bayraktar**'a,

Başarımdaki manevi katkısı çok büyük olan, sıkıntılı günlerimde gösterdiği sonsuz anlayış ve sabrıyla beni rahatlatan, varlığıyla huzur veren canım annem **Neriman Sunal**'a, beni bugünlere getiren, her konuda beni destekleyen aldığım kararlarda hep yanımda olan, bana çalışma azmini aşıl原因 canım babam **Erdinç Sunal**'a

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Periodontitis	4
2.1.1. Periodontitisde Rol Oynayan Mikroorganizmalar	6
2.2. Klinikteki Tedavi Yöntemleri	6
2.2.1. Cerrahisiz Periodontal Tedavi (Başlangıç Tedavisi)	7
2.2.1.1. Supragingival Plak Kontrolü	7
2.2.1.1.1. Supragingival Diş Yüzeyi Temizliği	8
2.2.1.1.2. Plak Retansiyon Faktörlerinin Kaldırılması	8
2.2.1.2. Subgingival Plak Kontrolü	8
2.2.1.2.1. Subgingival Diş Yüzeyi Temizliği	9
2.2.1.3. Kök Yüzeyi Düzleştirme	9
2.2.1.4. Diştaşı Temizliği ve Kök Yüzeyi Düzleştirmesinin Kısıtlamaları	9
2.2.2. Cerrahi Periodontal Tedavi	10
2.2.2.1. Rezektif Periodontal Tedavi	10
2.2.2.1.1. Gingivektomi-Gingivoplasti	10
2.2.2.1.2. Flep Operasyonu	11
2.2.2.1.3. Osteoplasti-Osteotomi	11
2.3. Rejeneratif Periodontal Tedavi	11
2.3.1. Kemik Greftleri	12
2.3.1.1. Ototogreftler	13
2.3.1.1.1. Intraoral Ototogreftler	14
2.3.1.1.2. Ekstraoral Ototogreftler	14
2.3.1.2. Allogreftler	15
2.3.1.2.1. Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allogreftleri	16
2.3.1.2.2. Dekalsifiye Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allogreftleri	16
2.3.1.3. Zenogreftler	16

2.3.1.4. Alloplastlar	17
2.4. Yönlendirilmiş Doku/Kemik Rejenerasyonu	18
2.4.1. Bariyer Membran Üretiminde Kullanılan Malzemeler	20
2.4.1.1. Politetrafloroetilen (PTFE) Membranlar	20
2.4.1.2. Kollajen Membranlar.....	21
2.4.1.3. Sentetik Polimerlerden Üretilen Membranlar.....	21
2.4.1.4. Kitosan Membranlar	22
2.4.1.5. Seramik Bazlı Malzemeler	24
2.4.2. Hidroksiapatit Üretim Yöntemleri.....	27
2.4.2.1. Biyomimetik Çöktürme Yöntemi	27
2.4.2.2. Mikrodalga Teknolojisi ve Mikrodalga Destekli Kalsiyum/Fosfat Sentezi	27
2.4.3. Bariyer Membran Üretim Yöntemleri	29
2.4.3.1. Çözücü Döküm-Partikül Uzaklaştırma Yöntemi.....	29
2.4.3.2. Elektroğırme Yöntemi	29
2.5. Periodontal Rejenerasyonda Antimikrobiyal Ajanların Kullanılması.....	31
2.6. Periodontal Rejenerasyonda Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri	32
2.6.1. Enamel Matriks Türüvi.....	35
2.7. Periodontal Rejenerasyonda İleri Yaklaşımlar	38
2.7.1. Gen Terapi	38
2.7.2. Kök Hücreler	39
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	41
3.1. Kullanılan Malzemeler	41
3.2. Gözenekli Kitosan Membranların Hazırlanması	42
3.3. Kitosan Membran Yüzeyinin HA ile Kaplanması.....	42
3.4. Membranın Gliserin Çözeltisi ile Muamele Edilmesi	43
3.5. Kitosan Membrana BMP-6 Yüklenmesi	44
3.6. Kitosan Membranın Elektroğırme Yöntemi ile PCL Nanofiberler ile Kaplanması ...	44
3.7. Geliştirilen Membranın Karakterizasyonu	45
3.7.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi.....	45
3.7.2. Şişme Çalışmaları.....	45
3.7.3. Membran Biyobozunurluğunun İncelenmesi	45
3.7.4. Mekanik Dayanım Testi	46
3.7.5. Temas Açısı Ölçümü	46
3.8. Metronidazol Salımı	47
3.9. Antibakteriyel Etkinlik	47
3.10. Hücre Kültür Çalışmaları.....	48

3.10.1. MC3T3-E1 Preosteoblast Hücreleri ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışması..	48
3.10.1.1. Hücre Kültürü Koşulları	48
3.10.1.2. PrestoBlue Analizi.....	49
3.10.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi (SEM).....	49
3.10.1.4. Alkalen Fosfataz (ALP) Boyama	49
3.10.1.5. RT-PCR Analizleri	50
3.10.2. MDBK Hücreleri ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışması	52
3.10.2.1. Hücre Kültür Koşulları	52
3.10.2.1. PrestoBlue Analizi.....	53
3.10.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi (SEM).....	53
3.11. İstatistiksel Analiz	53
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....	54
4.1. Kitosan Membran Üretimi.....	54
4.2. Kitosan Membran Yüzeyinin HA ile Kaplanması.....	61
4.3. Kitosan Membranın PCL Fiberler ile Kaplanması	64
4.3.1. <i>In Vitro</i> Metronidazol Salımı.....	68
4.3.2. Antibakteriyel Etkinlik	72
4.4. Geliştirilen Bariyer Membranın Karakterizasyonu	74
4.4.1. SEM Analizi	74
4.4.2. Şişme Çalışmaları.....	75
4.4.3. Temas Açısı Ölçümü	77
4.4.4. Mekanik Dayanım Testi	78
4.4.5. Enzimatik Bozunma	80
4.5. Hücre Kültür Çalışmaları	81
4.5.1. MC3T3-E1 Hücre Kültür Çalışması.....	81
4.5.1.1. PrestoBlue Analizi.....	81
4.5.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	84
4.5.1.3. Alkalen Fosfataz (ALP) Boyaması.....	91
4.5.1.4. RT-PCR Analizleri	93
4.5.2. MDBK Hücre Kültür Çalışması	97
4.5.2.1. PrestoBlue Analizi.....	97
4.5.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	99
5. GENEL SONUÇLAR	105
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Periodontiumu oluşturan temel yapılar	5
Şekil 2.2. Periodontal rejenerasyonda rol oynayan üç ana bileşen.....	12
Şekil 2.3. YDR/YKR tekniğinde bariyer membran kullanımı	19
Şekil 2.4. Kitosanın yapısı.....	23
Şekil 2.5. Elektroğirme sisteminin şematik gösterimi	30
Şekil 4.1. Tez kapsamında geliştirilen bariyer membranın hazırlanma aşamalarının şematik gösterimi	55
Şekil 4.2. Farklı sürelerde NaOH ile muamele edilen gözenekli kitosan membranlara (4:1 silika/kitosan, ağırlıkça) ait yüzey SEM görüntüleri: (a) 2 saat, 100X; (b) 6 saat, 100X; (c) 12 saat, 100X; (d) 24 saat, 100X; (e) NaOH ile muamele edilmeyen kitosan membran	56
Şekil 4.3. Kitosan membranın (4:1 silika/kitosan, ağırlıkça) hava ile temas eden yüzeyi (gözenekli yüzey) ve Petri kabı ile temas eden yüzeyi'ne (gözeneksiz yüzey) ait SEM görüntüleri: (a) gözenekli yüzey, 250X; (b) gözenekli yüzey, 1,000X; (c) gözeneksiz yüzey, 100X; (d) gözeneksiz yüzey, 250X	57
Şekil 4.4. Kitosan membranın (8:1 silika/kitosan, ağırlıkça) gözenekli yüzeyine ait SEM görüntüleri: (a) 100X; (b) 250X; (c) 500X; (d) 1,000X	58
Şekil 4.5. Kitosan membranın (8:1 silika/kitosan, ağırlıkça) gözeneksiz yüzeyine ait SEM görüntüleri: (a) 100X; (b) 250X; (c) 500X; (d) 1,000X	59
Şekil 4.6. Kitosan membrana (8:1 silika/kitosan, ağırlıkça) ait kesit SEM görüntüleri: (a) gliserin ile muamele edilmiş, 150X; (b) gliserin ile muamele edilmiş, 250X; (c) gliserin ile muamele edilmemiş, 150X; (d) gliserin ile muamele edilmemiş, 250X.....	60
Şekil 4.7. Mikrodalga yardımı ile 10xSBF çözeltisinde 4 kez kaplama yapılmış kitosan/HA membranlara ait SEM görüntüleri: (a) 1,000X, (b) 10,000X, (c) 15,000X, (d) 20,000X, (e) 30,000X, (f) 60,000X	63
Şekil 4.8. PCL fiber kaplı membran yüzeylerine ait SEM görüntüleri: (a) 3 dk, 500X; (b) 3dk, 2,000X; (c) 7 dk, 500X; (d) 7 dk, 2,000X	65
Şekil 4.9. Mz içeren PCL fiberler ile kaplı membran yüzeyi: (a) % 5 Mz içeren PCL fiberler, 2,000X; (b) % 5 Mz içeren PCL fiberler, 5,000X; (c) % 10 Mz içeren PCL fiberler, 2,000X; (d) %10 Mz içeren fiberler, 5,000X; (e) % 15 Mz içeren PCL fiberler, 2,000X; (f) % 15 Mz içeren PCL fiberler, 4,800X	67
Şekil 4.10. Mz ile PCL arasında oluşan hidrojen bağlarının şematik gösterimi	70
Şekil 4.11. Farklı miktarlarda Mz içeren PCL fiberler ile kaplı kitosan membranlardan kümülatif Mz salım grafiği.....	70

Şekil 4.12. Membranlardan salınan metronidazol'un antibakteriyel etkinliği: (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S. aureus</i> , (c,d) <i>B. fragilis</i>	72
Şekil 4.13. Tez kapsamında geliştirilen bariyer membrana ait kesit SEM görüntüleri: (a) 150X, (b) 250X	75
Şekil 4.14. HA/Ch/PCL membrana ait zamana karşı şişme oranları (Şişme ortamı: PBS, pH:7.4, 37°C).....	76
Şekil 4.15. Membran yüzeylerinde su temas açıları: (a) Ch/PCL membran, (b) Ch/PCL/%15 Mz membran.....	77
Şekil 4.16. HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranlara ait gerilim-gerinim eğrileri: (a) HA/Ch kuru haldeki, (b) HA/Ch ıslak haldeki, (c) HA/Ch/PCL kuru haldeki, (d) HA/Ch/ PCL ıslak haldeki	79
Şekil 4.17. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait PrestoBlue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu HA/Ch iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001)	82
Şekil 4.18. Kitosan membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 1,000X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 5,000X; (e) 7. gün, 250X; (f) 7. gün, 1,000X; (g) 7. gün, 2,500X; (h) 7. gün, 5,000X; (i) 14. gün, 250X; (j) 14. gün, 1,000X; (k) 14. gün, 2,500X; (l) 14. gün, 5,000X.....	85
Şekil 4.19. HA/Ch membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 1,000X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 7. gün, 100X; (f) 7. gün, 500X; (g) 7. gün, 5,000X; (h) 7. gün, 10,000X; (i) 14. gün, 250X; (j) 14. gün, 500X; (k) 14. gün, 1,000X; (l) 14. gün, 2,500X; (m) 14. gün, 10,000X.....	87
Şekil 4.20. HA/BMP-6/Ch membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 1,000X; (d) 2. gün, 1,000X; (e) 7. gün, 250X; (f) 7. gün, 1,000X; (g) 7. gün, 1,000X; (h) 7. gün, 2,500X; (i) 14. gün, 250X; (j) 14. gün, 1,000X; (k) 14. gün, 1,000X; (l) 14. gün, 5,000X	89
Şekil 4.21. HA/Ch/PCL membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 2,500X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 2. gün, 5,000X; (f) 7. gün, 250X; (g) 7. gün, 1,000X; (h) 7. gün, 2,500X; (i) 7. gün, 5,000X; (j) 7. gün, 10,000X; (k) 14. gün, 500X; (l) 14. gün, 1,000X; (m) 14. gün, 2,500X; (n) 14. gün, 5,000X	90
Şekil 4.22. Kitosan bazlı membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP boyama sonrası optik mikroskop görüntüleri: Ch membran: (a) 7. gün, 20X; (e) 14. gün, 20X; (i) 21. gün, 20X; HA/Ch membran: (b) 7. gün, 20X; (f) 14. gün, 20X; (j) 21. gün, 20X; HA/BMP-6/Ch membran: (c) 7. gün, 20X; (g) 14. gün, 20X; (k) 21. gün, 20X; HA/Ch/PCL membran: (d) 7. gün, 20X; (h) 14. gün, 20X; (l) 21. gün, 20X.....	92

Şekil 4.23. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl kollajen I gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken ** p<0.01)	93
Şekil 4.24. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl RunX2 gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken ** p<0.01, *** p<0.001).....	94
Şekil 4.25. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl OCN gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken *** p<0.001, kontrol grubu HA/Ch iken # # p<0.01, kontrol grubu HA/BMP-6/Ch iken . . p<0.01).....	95
Şekil 4.26. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl OPN gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken ** p<0.01, *** p<0.001, kontrol grubu HA/Ch iken # p<0.05, kontrol grubu HA/BMP-6/Ch iken . p<0.05)	96
Şekil 4.27. Ch, Ch/PCL, Ch/PCL/Mz ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait PrestoBlue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Ch/PCL iken # p<0.05, # # p<0.01, # # # p<0.001; kontrol grubu Ch/PCL/Mz iken . p<0.05, . . p<0.01, . . . p<0.001)98	98
Şekil 4.28. Ch membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 100X; (b) 2. gün, 2,500X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 2. gün, 5,000X; (f) 8. gün, 100X; (g) 8. gün, 250X.....	101
Şekil 4.29. Ch/PCL membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 5,000X; (e) 8. gün, 250X; (f) 8. gün, 1,000X; (g) 8. gün, 2,500X; (h) 8. gün, 5,000X.....	102
Şekil 4.30. Ch/PCL/Mz membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 1,000X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 8. gün, 100X; (f) 8. gün, 250X; (g) 8. gün, 1,000X; (h) 8. gün, 2,500X.....	103
Şekil 4.31. HA/Ch/PCL membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 2,500X (d) 2. gün, 5,000X; (e) 8. gün, 100X; (f) 8. gün, 250X; (g) 8. gün, 500X; (h) 8. gün, 1,000X; (ı) 8. gün, fiber arkası, 250X; (j) 8. gün, fiber arkası, 1,000X; (k) 8. gün, membran gözeneksiz yüzey, 250X; (l) 8. gün, membran gözenekli yüzey, 500X	104

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Ticari kemik greftleri.....	18
Çizelge 2.2. Ticari bariyer membranlar.....	25
Çizelge 2.3. Çeşitli büyüme faktörlerinin <i>in vitro</i> koşullarda PDL, sementoblast ve osteoblast hücrelerine etkisi.....	37
Çizelge 3.1. 10xSBF benzeri çözelti reçetesi	44
Çizelge 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri	52
Çizelge 4.1. Kitosan membrana ait fiziksel özellikler.....	60
Çizelge 4.2. PCL fiber çapları	67
Çizelge 4.3. Standart antibiyotiklerin antibakteriyel etkinlikleri	74
Çizelge 4.4. Tez kapsamında geliştirilen bariyer membrana ait şişme karakteristiği	75
Çizelge 4.5. PCL fiberler ile kaplı membran yüzeylerinden elde edilen su temas açısı değerleri.....	77
Çizelge 4.6. Membranların mekanik özellikleri	78

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
β	Beta
ε	Epsilon

Kısaltmalar

ALP	Alkalen fosfataz
BMP	Kemik morfojenik proteini
cDNA	Komplementer DNA
DBM	Demineralize kemik grefti
DFDBA	Dekalsifiye dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
EMD	Enamel matriks türevi
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Food and Drug Administration
FDBA	Dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAM	Gen ile aktiveleştirilmiş matris
HA	Hidroksiapatit
HMDS	Hekzametildisilazan
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
KOL I	Kollajen I
MC3T3-E1	Fare preosteoblast hücre hattı

MDBK	Madine Darby Bovine Kidney hücre hattı
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
Mz	Metronidazol
OCN	Osteokalsin
OE	Osteotomi
OP	Osteoplasti
OPN	Osteopontin
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCL	Poli-ε-kaprolakton
PDGF	Platelet türevli büyüme faktörü
PDL	Periodontal ligament
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PTFE	Politetrafloroetilen
rh	Rekombinant insan
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SBF	Yapay vücut sıvısı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TCP	Trikalsiyum fosfat
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü-β
YDR	Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu
YKR	Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu
α-MEM	Minimum Essential Medium-α

1. GİRİŞ

Periodontitis, dişi çevreleyen ve destekleyen periodontium tabakasını yıkıma uğratan kronik iltihaplı bir hastalıktır. Ayrıca, solunum sistemi rahatsızlıkları, diyabet, kemik erimesi ve kalp damar hastalıkları gibi çeşitli sistemik hastalıklarla ilişkilidir [1]. Periodontal dokuların rejenerasyonu karmaşık iltihap etkisinden dolayı zorlaşmakta, bu nedenle klinikte doku iyileşmesine yönelik olarak yapılan tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır [2]. Klinik ve/veya cerrahi müdahaleler periodontal dokuların sağlığını yeniden kazanmasında zorunlu basamaklardır. Son yıllarda periodontal dokuların rejenerasyonuna yönelik çeşitli yöntemler önerilmiştir ve bu yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar; cerrahi yaklaşımları, bariyer membranları, kemik greftlerini ve diğer osteokondüktif/osteoindüktif materyalleri ya da protein karışımlarını, büyüme faktörlerini, hücre bazlı teknolojileri ve rekombinant gen teknolojilerini içermektedir [3].

Periodontal rejenerasyonun temel amacı iltihaplı dokuları tamamen elimine etmek ve alveolar kemiğe periodontal ligamentlerle bağlı yeni kemik dokunun oluşumunu sağlamaktır. Bu bağlamda **Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR)** ve **Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu (YKR)** teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır [4]. Geleneksel tedavi yöntemleri uygulamalarından sonra periodontal rejenerasyonu engelleyen temel nedenin; hasarlı bölgeye, epitel hücrelerin mezenkimal hücrelerden daha hızlı bir şekilde göç etmesi olduğu düşünölmektedir. Hasarlı bölgeye göç eden epitel hücreler uzun bağlantı epitelleri oluşturarak, periodontitis sonucu hasara uğramış kök yüzeyinde yeni bağlantı dokularının oluşmasını ve böylelikle hasarlı bölgede kemik oluşumunu engeller [2, 4, 5]. YDR ve YKR yöntemleri, hasarlı bölgeye epitel hücre göçünü engelleyerek periodontal rejenerasyonu gerçekleştirmek amacıyla bariyer olarak görev yapan membranlar kullanılır. Bu teknikler osteoblast üremesi ve kemik rejenerasyonu için gerekli süreyi sağlayarak hasarlı bölgede hücrelerin repopüle olmasını destekler [6].

YDR/YKR tekniğinde kollajen, kitosan, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli-ε-kaprolakton (PCL) ve bunların kopolimerleri gibi rezorbe olan ve politetrafloroetilen (PTFE) gibi rezorbe olmayan çeşitli membranlar kullanılmaktadır [3]. Kitosan sahip olduğu üstün özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın bir kullanım potansiyeline sahiptir [2]. Ancak kitosanın kırılğan doğası ve yetersiz biyoaktivitesi klinikteki kullanımını kısıtlamaktadır [7]. Kitosanın yetersiz biyoaktivitesini arttırmak amacıyla kitosan, hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP), silika ve biyoaktif cam gibi inorganik biyoaktif malzemelerle bir arada kullanılır [8].

Periodontal rejenerasyonda kemik morfojenik proteinleri (BMPs), transforme edici büyüme faktörü- β , fibroblast büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve platelet-türevli büyüme faktörü gibi çeşitli büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Periodontal farklılaşma yeteneğinden dolayı kemik morfojenik proteinleri periodontal rejenerasyonda diğer büyüme faktörlerinden daha çok tercih edilmektedir. Literatürde kemik doku mühendisliği ve periodontal sert doku rejenerasyonunda özellikle BMP-2,-4,-7 ve -12 yaygın olarak araştırılmaktadır. Ancak BMP-6'nın periodontal farklılaşmadaki yeteneğini araştıran oldukça az çalışma bulunmaktadır [1].

Yumuşak dokudaki iltihap etkisini ortadan kaldırmak amacıyla membranlardan antibakteriyel ilaç salımının yapıldığı çalışmalar da mevcuttur [3]. Biyouyumlu olması ve bozunma ürünlerinin toksik olmaması nedeniyle, PCL kontrollü ilaç salımı uygulamalarında kullanılan en uygun biyomalzemelerden bir tanesidir [9]. Metronidazol klinikte 45 yılı aşkın bir süredir oral hastalıkların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ve antiprotozoal bir ilaçtır, ayrıca gram-negatif anaerobik bakterilere karşı etkilidir [10, 11].

Periodontal uygulamalarda elektroğirme yöntemi ile üretilmiş 3 boyutlu nanofiber membranlar da kullanılmaktadır. Bu yöntemle üretilen membranlar sağladıkları geniş yüzey alanıyla hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve infiltrasyonuna olanak sağlarlar [12]. Elektroğirme yöntemiyle üretilen fiberler yüksek enkapsülasyon verimine ve yüksek yapısal kararlılığa sahiptirler. Bu nedenle kontrollü ilaç salım uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [13].

Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonunda, geliştirilen tüm membran türleri hasarlı bölgeye adapte edilmiştir. Ancak membranların pek çoğunun performansı, zayıf mekanik dayanımlarından dolayı yetersiz olmuştur. Geliştirilen membranlar zayıf mekanik dayanım dışında yapısal ve biyo-fonksiyonel dezavantajlara da sahip olabilmektedirler. Günümüzde, membranların sahip oldukları dezavantajları elimine ederek özgün nitelikte membranlar geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir [14].

Sunulan tez çalışmasının amacı, literatürde mevcut olan ve klinik kullanıma da sunulmuş bulunan bariyer membranlarda karşılaşılan önemli problemleri çözebilecek özgün yaklaşımlarla yeni bir bariyer membranın geliştirilmesi ve böylelikle bariyer membranların klinik kullanımının kolaylaştırılmasıdır. Bu amaçla gözenekli kitosan membranlar çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile üretilmiş ve kitosanın yetersiz biyoaktivitesini iyileştirmek amacıyla membranın sert doku ile temas edecek olan gözenekli yüzeyi

mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak HA ile kaplanmıştır. Hidroksiapatitin kemik rejenerasyonu için yeterli olmayabileceği dikkate alınarak HA kaplı membran yüzeyi BMP-6 ile de zenginleştirilmiştir. Bu şekilde oluşturulan gözenekli kitosan+biyomimetik HA+BMP-6'dan oluşan membran (HA/BMP-6/Ch) yüzeyinin kemik hücrelerinin proliferasyonu ve doku rejenerasyonu için yeterli etkinliğe sahip olacağı düşünülmüştür. Epitel hücre göçünün engellenmesi ve inflamasyonun önüne geçilmesi için kitosan membranın üretim sırasında Petri kabı ile temas ettiği için gözeneksiz olan tarafı elektroegirme yönteminden yararlanarak antibakteriyal ajan (metronidazol) içeren PCL nanofiberler ile kaplanmıştır. Ayrıca kitosanın kırılma doğası uygun bileşim ve koşullardaki gliserin muamelesi ile giderilerek kolay bir şekilde manipüle edilebilen şekil hafızalı bir bariyer membran geliştirilmiştir. Geliştirilen bariyer membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyeli membranın sert doku ile temas edecek olan gözenekli kısmında kemik öncülü hücre hattı olan MC3T3-E1 hücre hattı ve yumuşak doku ile temas edecek olan gözeneksiz yüzeyinde ise epitel yapıdaki MDBK hücreleri ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları ile belirlenmiştir. Konu ile ilgili literatür bilgileri, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar devam eden bölümlerde sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili olarak literatürde yer alan bilgiler 7 ana başlık altında özetlenmiştir. İlk kısımda periodontitise yer verilmiş, ardından klinikte periodontitis tedavisine yönelik olarak yapılan çalışmalardan bahsedilmiştir. Üçüncü bölümde rejeneratif tedavi yöntemlerinden özellikle de kemik greftlerinden bahsedilmiştir. Dördüncü bölümde rejeneratif tedavi yöntemlerinden bir diğeri olan yönlendirilmiş doku/kemik rejenerasyonu detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Bu bölümde bariyer membran üretiminde kullanılan malzelelerden, membran üretim yöntemlerinden ve hidroksiapatit üretim yöntemlerinden bahsedilmiştir. Sonraki bölümde periodontal rejenerasyonda kullanılan antibiyotiklere yer verilmiştir. Altıncı bölümde büyüme ve farklılaşma faktörlerinin periodontal rejenerasyona etkisinden bahsedilmiştir. Son bölümde ise periodontal rejenerasyonda kullanılan ileri yaklaşımlara yer verilmiştir.

2.1. Periodontitis

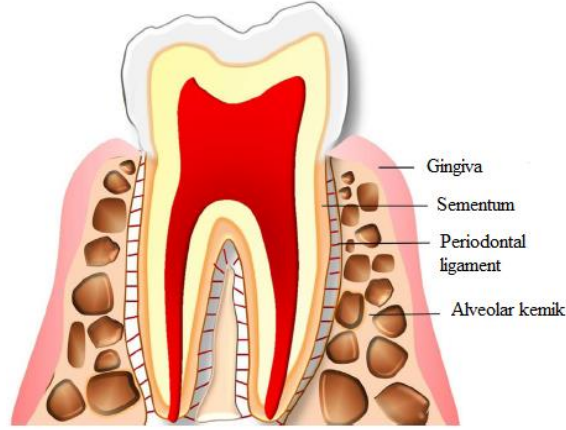
Periodontal hastalıklar, gingivitis (diş eti iltihabı) ve periodontitisi içeren oral inflamatuvar enfeksiyonlardır. Gingivitis, diş yüzeyine yapışan biyofilm tabakasına gösterilen tepkidir ve yıkıcı olmayan bir periodontal hastalıktır. Gerekli tedavi yapılmazsa hastalığın daha şiddetli ve yıkıcı formu olan periodontitise dönüşebilir [15].

Periodontium diş çevreleyen ve destekleyen mineralize ve fibröz dokulardan oluşmaktadır. Alveolar kemik, gingiva, sementum ve periodontal ligament (PDL) periodontiumun temel bileşenleridir (Şekil 2.1). Alveolar kemik ve sementum periodontiumu oluşturan mineralize sert dokulardır. PDL ve gingiva ise periodontiumu oluşturan fibröz ve yumuşak dokulardır [16].

Periodontitis mikroorganizmaların neden olduğu, alveolar kemik, sement, periodontal ligament ve diş etini içeren periodontal dokuları yıkıma uğratan ve buna bağlı olarak diş kaybı ile sonuçlanan kronik iltihaplı bir hastalıktır [3]. Periodontitis diş eti ile diş kökü arasında yumuşak doku cepleri ya da derinleşen çatlak oluşumu ile sonuçlanırken, şiddetli periodontitis ağrı, rahatsızlık ve nihai diş kaybı ile sonuçlanabilir. Biyofilm tabakasında bulunan patojenik mikroorganizmalara ek olarak özellikle tütün kullanımı gibi genetik ve çevresel faktörler de periodontal hastalığı tetiklemektedir [17].

Çeşitli araştırmalar sonucu elde edilen bulgular, periodontitisin diyabet, kardiovasküler ve solunum rahatsızlığı gibi sistemik rahatsızlıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir [18]. Diş

ve Kraniofasial Araştırmalar Ulusal Enstitüsü'nden (National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIDCR, National Institutes of Health, United States) elde edilen verilere göre, 70 yaş üzerindeki yetişkin insanların %90'ında orta seviyede periodontal hastalığa rastlanmaktadır [19].



şekil 2.1. Periodontiumu oluşturan temel yapılar [16]

Genellikle dental biyofilm tabakası ve bu tabakanın ürünleri, periodontal hastalık için başlıca etiyolojik faktörlerdir. Biyofilm tabakasından salınan lipopolisakkaritler, antijenler ve diğer virülans faktörler diş eti dokusuna erişim sağlar ve konak savunma hücrelerini aktive ederek inflamatuvar ve bağışıklık tepkisi başlatır [20]. Konağın tepkisinin periodontal hastalıktaki rolü, B ve T lenfositleri, nötrofil ve monosit/makrofajlar ile aracılık edildiği kabul edilen hücre infiltrasyonu bakımından karmaşıktır. Bu hücreler, doku bozunması ve kemik erimesine katkı sağlayan sitokinler, kemokinler, arakidonik asit metabolitleri ve proteolitik enzimleri içeren inflamatuvar mediyatörleri üretmek için uyarılır.

Periodontitis öncesinde gingivitis meydana gelir ancak her gingivitis olgusu periodontitise dönüşmez. Periodontitis genellikle yavaş ilerleyen ve ilerleme hızı günlerle ifade edilmeyen kronik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Hastalığın değişik formları vardır ve bu formlara bağlı olarak ilerleme hızları farklılık gösterir.

Periodontitis devamı olduğu gingivitisin bulgularını taşımaktadır. Bu bulgular; diş etinde hiperemi, kanama, şekil bozukluğu, gingival sulkus derinliğinde artış ve diş etinde ödemdir. Periodontitiste saptanan klinik bulgular, bu bulgulara ek olarak diş etinin dişe daha apikalde tutunması, cep derinliğinin artması ve diş etinde zaman zaman fibrozisin gözlemlenmesidir. Diş etindeki şekil değişikliği belirgindir ve hastalık derin dokulara yayıldığı için alveolar kemikte rezorbsiyon, periodontal ligamette yıkım vardır. Kemikteki rezorbsiyon cep

derinliğindeki artış ile anlaşılır. Normalde alveolar kemik mine-sement sınırının hemen 1-2 mm altında, komşu iki dişin mine-sement sınırını birleştiren hayali çizgiye paralelken, artık daha apikal dedir.

Periodontitisin ilerleme hızı kişiden kişiye farklılık gösterirken, aynı ağızda değişik dişlerde hatta aynı dişin farklı bölgelerinde farklı hızla gelişebilir. Ağızda dişlerin hastalıktan etkilenme sıklıkları farklılık göstermektedir. Buna, üst molarların alt molarlara göre hastalıktan daha fazla etkilenmesi örnek olarak verilebilir [21].

2.1.1. Periodontitisde Rol Oynayan Mikroorganizmalar

Periodontitisin oluşmasında bir çok lokal, çevresel ve sistemik faktörler rol oynamasına rağmen primer etiyolojik etken mikrobiyal dental plak ve ürünleridir. Hastalık yapan bakterilere patojen bakteriler denir ve sahip oldukları virülans faktörleri ile konak dokularında yıkım meydana getirirler. Periodontal hastalıkta pek çok bakteri rol oynamasına rağmen daha çok *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Camphylobacter rectus* (*C. rectus*), *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) ve *Treponema denticola* (*T. denticola*) periodontal hastalıklarla doğrudan ilişkili bulunmuştur [22].

2.2. Klinikteki Tedavi Yöntemleri

Periodontal hastalıklar plak mikroorganizmaları tarafından oluşturulur. Enflamasyonun şiddeti ve periodontal yıkımın hızı mikroorganizmaların türü ve etkilerinin yanında, konağın immunolojik yanıtına da bağlıdır [21]. Periodontal tedavinin amacı, periodontitise neden olan mikrobiyal etiyolojiyi ve risk faktörlerini tamamen ortadan kaldırarak, hastalığın ilerlemesini durdurmak, aynı zamanda enflamasyonu azaltmak ve defektlerin iyileşmesini sağlamaktır, böylelikle periodontal dokuların yeniden eski sağlıklı haline dönmesi hedeflenmektedir. Periodontal tedavinin bir diğer hedefi de hastalığın tekrarının önlenmesidir [23]. Cepteki mekanik debridmanın; diş kaybı riskini, periodontal hastalığın ilerleme hızını önemli ölçüde azalttığı ve diş etindeki enfeksiyonu iyileştirdiği kanıtlanmıştır [24].

Periodontitis için kesin bir tanı konulduktan sonra tedavi planı belirlenir. Tedavi planını belirleyen faktörler;

- Tıbbi geçmiş, klinik bulgular ve teşhis
- Hastanın isteği, ilgisi ve katılımı
- Vakanın prognozudur.

Periodontitis vakalarının geleneksel olarak tedavisi 2 temel basamakta gerçekleşir. Bunlar cerrahisiz periodontal tedavi ya da bir diğer adıyla başlangıç tedavisi ve cerrahi periodontal tedavidir [25].

2.2.1. Cerrahisiz Periodontal Tedavi (Başlangıç Tedavisi)

Cerrahisiz tedavi, periodontitisin tedavisinde çok önemli bir rol oynamaktadır ve periodontal tedavinin tüm aşamalarında temel işlemdir. Yapılan klinik çalışmalarda, periodontal tedavinin uzun süreli başarısının başlangıç tedavisinin başarısına bağlı olduğu gösterilmiştir. Gerek duyulursa cerrahi tedaviye geçilir.

Cerrahisiz periodontal tedavinin amaçları [21];

- Patojenik mikrofloranın sağlıklı haldeki floraya dönüşmesi,
- Enflame patolojik ceplerin sağlıklı gingival dokuya dönüşmesi
- Derinleşmiş ceplerin büzülüp, sıg ve sağlıklı sulkusa dönüşmesi,
- Sağlıklı bağlantı dokuları ve epitel ataşmanla uyumlu kök yüzeyinin elde edilmesidir.

Cerrahisiz periodontal tedavi; plak kontrol eğitimi, supragingival ve subgingival küretaj, lokal anestezi ile kök yüzeyinin düzleştirilmesi, selektif mölleme ile okluzal düzenleme, stabilizasyon, endodontik tedavi ve yeniden değerlendirmeyi içerir.

Cerrahisiz periodontal tedavi sadece diş taşı temizlemesi ve kök düzeltmesini içermez aynı zamanda; hasta motivasyonu, ağız bakım eğitimi ve plak retansiyon faktörlerinin ortadan kaldırılması gibi oldukça önemli basamakları da içerir [26].

2.2.1.1. Supragingival Plak Kontrolü

Supragingival plak; diş plağının görünmesini sağlayan tabletler ve çözeltilerle değerlendirilir. Eğer bu tabletler ve çözeltiler kullanılmazsa, plağın şiddeti göz ardı edilebilir. Supragingival plağın yok edilmesinde çeşitli metotlar ve el aletleri ile ultrasonik aletler kullanılır [27]. Kimyasal olarak klorheksidin içeren ağız gargaraları da rutinde olmasa

da akut periodontal durumlarda kullanılabilir ancak klorheksidin periodontal cepler içindeki mikroorganizmalara etkili değildir. Asıl etkisi supragingival plaklardır.

Supragingival plak kontrolünün hastalar tarafında öğrenilmesi ve tam anlamıyla uygulanması tedavinin en önemli ve zorlayıcı aşamalarından biridir [26].

2.2.1.1.1. Supragingival Diş Yüzeyi Temizliği

Bu işlem, supragingival plak ve diş taşının diş yüzeyinden kaldırılması için uygulanır. Diş taşlarının yüzeylerindeki plak birikimini önlemek, yüzeylerinde barındırdığı bakteri ürünlerinin toksik etkilerini ortadan kaldırmak ve hastanın diş arası temizliğini rahat yapabilmesini sağlamak için cerrahisiz periodontal tedavi sırasında dişlerin yüzeylerindeki diş taşları kaldırılmalıdır [28].

2.2.1.1.2. Plak Retansiyon Faktörlerinin Kaldırılması

Subgingival sahaya taşan uygun olmayan dolgu veya kuron restorasyon kenarları kronik enflamatuvar ve periodontal hastalıklara neden olur veya olan hastalığın ilerlemesini sağlar. Yapılan çalışmalar, uygun olmayan restorasyon kenarlarının mekanik veya kimyasal irritasyona neden olmadığını, plak birikimini tetikleyerek periodontal hastalığın patogeneğinde rol oynadıklarını ortaya koymuştur. Bu nedenle, plak ve diş taşlarının kaldırılmasını kolaylaştırmanın yanısıra hastanın yapacağı günlük plak kontrolünü kolaylaştırmak için taşkın restorasyon kenarlarının kaldırılması gerekir [28].

2.2.1.2. Subgingival Plak Kontrolü

Subgingival plağın saptanabilmesi, plağın uzaklaştırılması kadar önemlidir. Subgingival plağın saptanılmasında kullanılan metotlar Hu-Friedy No. 3-A eksploratörü gibi özel olarak tasarlanmış eksploratörleri (dişçilikte kullanılan ve ucu dokunma hissini arttırmak amacıyla kanca şeklinde olan aletler), sıkıştırılmış hava ve radyografları içermektedir. Bu yöntemlerin hiçbiri tek başına yeterli değildir. En iyi sonuca ulaşabilmek için yukarıda verilen yöntemlerin bir arada kullanılması gerekir. Kullanılacak eksploratörün şekli önemlidir, her eksploratör bu amaç için kullanılmaz [29]. Subgingival plak yumuşak doku ile diş yüzeyi arasında gevşek olarak tutunmuş anaerob bakterilerce oluşturulur. Supragingival alandaki mikrobiyal dental plak subgingival alandaki mikroorganizmaları

besler ancak, cep derinliği arttıkça subgingival sahadaki mikroorganizmalar supragingival sahadaki mikrobiyal dental plaktan bağımsız olarak beslenebilir [30].

2.2.1.2.1. Subgingival Diş Yüzeyi Temizliği

Subgingival plak ve diştaşının kök yüzeyinden kaldırılması işlemidir. Biyolojik uygunluğu sağlayabilmek için, sementin yüzey düzensizliklerine derin olarak nüfuz eden plak ve diş taşının tamamen kaldırılması gerekir. Subgingival diş yüzeyi temizliği, periodontal tedavi amacıyla, plak ve diş taşının yanısıra cep ortamına açık sement yüzeyinin yapısında diş eti için toksik olan endotoksin ve enzim gibi toksik maddeler barınması sebebiyle tek başına yeterli değildir [28].

2.2.1.3. Kök Yüzeyi Düzleştirme

Kök yüzeyi düzeştirme, biyolojik olarak kabul edilebilir sert ve düzgün bir kök yüzeyi elde etmek amacıyla diş taşları, bakteri plağı ve toksinler tarafından kontamine edilmiş sementin ve dentin yüzeyinin kaldırılmasıdır [31].

Hastalıklı sementin yüzey tabakasında bulunan toksinler (gram negatif bakteri kaynaklı lipopolisakkaritler) kök yüzeyindeki epitel ve bağ dokusu ataşmanını inhibe eder. Plak ve diş taşları kaldırıldıktan sonra, kök yüzeyi sert ve düz hale gelinceye kadar kazınıp düzeştirilmelidir; düzgün olmayan kök yüzeyi plak retansiyonunu arttıracadığından oral hijyenin sağlanması zorluk yaratır [30].

2.2.1.4. Diştaşı Temizliği ve Kök Yüzeyi Düzleştirmesinin Kısıtlamaları

Diştaşı temizliği ve kök yüzeyi düzeştirmesi özellikle, şiddetli periodontitise sahip arka dişlerin tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Arka dişlerde meydana gelen derin periodontal ceplere tam olarak erişememe, gingiva ve kök yüzeyindeki bakteri plağına kısıtlı erişim tedavideki başlıca olumsuzluklardır [26]. Gerçekleştirilen klinik çalışmalar, periodontal cep derinliği arttıkça diş taşı temizliği ve kök yüzeyi düzeştirmesinin etkisiz kaldığı yönündedir [32]. Genellikle 7 mm ve 7 mm'den daha büyük boyuttaki cepler cerrahi tedavi yöntemleriyle kontrol edilmektedir [33].

2.2.2. Cerrahi Periodontal Tedavi

Cerrahisiz tedavi yöntemi başarısız olduğunda ya da bu yöntem ile istenen sonuç elde edilemediğinde cerrahi tedavi uygulamasına geçilir [34]. Cerrahi tedavi uygulaması, periodontal ceplerin eliminasyonu ve mukogingival defektlerin giderilmesini amaçlayan teknikler içerir.

Periodontal cerrahinin amacı şu şekilde belirtilmiştir;

- Periodontal cepleri yok etmek için yumuşak doku veya kemiğin kaldırılması ve/veya yeniden şekillendirilmesi,
- Yeni tutunan ve/veya yeniden adapte olan yumuşak doku veya kemik için uygun bir ortam yaratarak enflamatuvar periodontal dokuların uzaklaştırılması,
- Mukogingival defektlerin düzeltilmesi,
- Gingival büyüme sonucu açığa çıkan estetik kaygıların fazla yumuşak dokunun giderilmesiyle ortadan kaldırılması,
- Uygun bir restoratif ortamın kurulması,
- Kemik ve yumuşak doku rejenerasyonuna olanak sağlanması [35].

Cerrahi tedavi yöntemleri; rezektif ve rejeneratif periodontal tedavi olmak üzere 2'ye ayrılır. Rezektif periodontal tedavi gingivektomi-gingivoplasti, flep operasyonu, osteoplasti-osteotomi gibi tedavi yöntemlerini içerir [28].

2.2.2.1. Rezektif Periodontal Tedavi

Rezektif cerrahi yüzyılı aşkın bir süredir periodontitis tedavisinde kullanılmaktadır. Periodontal dokulardaki patolojilerin giderilmesinde rejeneratif tedavi yöntemlerinin rezektif yöntemlere göre daha üstün olduğu belirtilse de, rejeneratif yöntemlerin tek başına bütün problemleri çözemeyeceği bilinmektedir [36].

2.2.2.1.1. Gingivektomi-Gingivoplasti

Gingivektomi, hastalıklı diş eti dokusunun cerrahi olarak çıkarılmasıdır. Bu yöntem, periodontal cebin inflamatuvar duvarının bir kısmını uzaklaştırarak periodontal cebin derinliğini azaltmak için gerçekleştirilir. Gingivoplasti, anatomik açıdan normal ve fizyolojik olarak yararlı diş eti konturları oluşturmak için diş eti dokusunun yeniden şekillendirilmesidir. Gingivoplasti işlemi sonrasında periodontal cep derinliğinde herhangi bir azalma meydana gelmez. Bu 2 yöntem genellikle bir arada kullanılır [37].

2.2.2.1.2. Flep Operasyonu

Periodontal flep, diş eti ve oral mukozanın diş ve alveolar kemikten yatay ve/veya dikey kesitte ayrılan parçasıdır. Periodontal flep en az bir alandan alveolar mukozanın kalan kısmına bağlıdır [26]. Flep operasyonu kemik ve kök yüzeyinin daha iyi görülebilmesi ve bölgeye daha rahat ulaşabilmek amacıyla gerçekleştirilir [28].

Flep operasyonunun sağladığı avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- Var olan keratinize diş eti korunur,
- Hasarlı bölgede görüş alanı artar ve inflamatuvar yumuşak doku ve dental plakların mkemmell bir şekilde temizlenmesine olanak sağlar,
- Kemik hasarının morfolojisi tanımlanır ve uygun tedavi uygulanır,
- Flep operasyonu oral epitel dokuyu korur [38].

2.2.2.1.3. Osteoplasti-Osteotomi

Osteoplasti (OP) alveol kemiğinin dişi destekleyen bölümünden herhangi bir çıkarım yapılmadan daha fizyolojik bir şekle getirilmesidir. Osteotomi (OE) ise alveol kemiğinin, dişi destekleyen bölümünden çıkarım yapılarak şekillendirilmesidir [28].

2.3. Rejeneratif Periodontal Tedavi

Periodontal rejenerasyonun temel amacı inflamasyonu elimine ederek, periodontitis sonucunda yıkıma uğrayan destek dokularının rejenerasyonunun sağlanması, yeni alveolar kemik, sement ve periodontal ligamentin oluşmasıdır [39].

Günümüzde kullanılan periodontal tedavi yöntemleri periodontal dokuların rejenerasyonundan çok onarımıyla sonuçlanmakta, yalnızca ilerleyen periodontal hastalığı durdurmakla kalmaktadır. Geleneksel tedavi yöntemleri ve periodontal flep operasyonu periodontiumu iyileştirir ancak orjinal anatomik ve morfolojik yapıyı sağlayamaz [40].

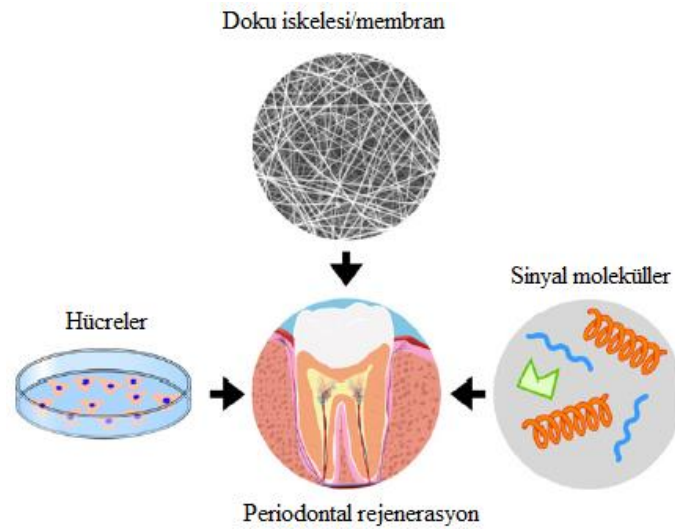
Cerrahisiz tedavi yöntemleri ve peridontal flep operasyonu ilerleyen periodontal hastalığı başarılı bir şekilde durdurmasına rağmen yumuşak dokularda çekilmeye neden olduğu için estetik açıdan sıkıntı yaratabilir [4]. Bunun dışında geleneksel tedavi yöntemleri ile subgingival plağın tamamen uzaklaştırılmaması periodontitisin tekrarlamasına neden olmaktadır. Uzaklaştırılmayan bakteriler periodontal cep içerisinde gelişmeye devam ederek hastalığı tetikleemektedir [21]. Cerrahisiz ve cerrahi periodontal tedavinin bir diğer

dezavantajı da, uygulanan tedavi sonrasında uzun bağlantı epitellerinin oluşmasıdır. Periodontal tedaviden sonra dokular kök yüzeyine daha dayanıklı olan yeni bağlantı dokusu oluşumuyla bağlanmak yerine daha zayıf olan uzun bağlantı epiteliyle bağlanmakta ve uzun bağlantı epiteli plak birikimine bağlı olarak tekrarlayan inflamasyon etkisiyle kolaylıkla kırılmaktadır [41].

Yetişkinlerde periodontiumun yenilenme potansiyeli oldukça sınırlıdır, dolayısıyla sadece terapötik müdahaleler periodontiumun yenilenmesini sağlar. Böylelikle; hasara uğramış dokuların morfolojik yapıları ve fonksiyonları yeniden bütünlük kazanır [42].

Periodontal rejenerasyonda temel olarak doku iskelesi ya da membran, rejeneratif ya da kök hücreler ve sinyal molekülleri ya da büyüme faktörleri gibi üç ana unsurun etkileşimi önemlidir (Şekil 2.2) [3].

Rejeneratif periodontal tedavi, periodontitis sonucu hasara uğrayan periodontal dokuları yeniden yapılandırmak için sert ve yumuşak doku greftleri ya da yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılan bariyer membranlar gibi çeşitli yöntemler kullanır [43].



Şekil 2.2. Periodontal rejenerasyonda rol oynayan üç ana bileşen [3]

2.3.1. Kemik Greftleri

Kemik greftleri hasarlı bölgeye yerleştirildiğinde alveolar kemik, sement ve periodontal ligamentin rejenerasyonunu destekleyecek niteliklere sahip malzemelerdir. İdeal bir kemik greft materyalinin sahip olması gereken bazı özellikler vardır.

Bu özellikler şu şekilde sıralanabilir;

- Biyouyumlu olmalı (immünolojik tepkiye neden olmamalı)
- Karsinojenik, toksik ve antijenik olmamalı
- Osteokondüktif olmalı (hücre yapışmasına, çoğalmasına ve göçüne izin verecek yüzey sağlamalı)
- Osteogenezi uyarabilmeli
- Hasta ve doktor açısından uygulaması kolay olmalıdır [44].

Kemik greftlerinin biyolojik açıdan performansı birbiriyle ilişkili, ancak benzer olmayan osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon gibi 3 temel mekanizmaya göre değerlendirilebilir.

Osteogenez: Greft materyalinin taşıdığı kök hücreler ile yeni kemiğin oluşturulmasıdır.

Osteoindüksiyon: Uygulanan kemik greftinin içerdiği matris proteinleri ve büyüme faktörleri ile yerleştirildiği sağlam kemikteki, mezenkimal kök hücrelerin ve diğer öncül kemik hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasının uyarılmasıdır. Genelde kemik kökenli demineralize kemik greftlerinde (Demineralized bone matrix, DBM) bu etki gözlenir.

Osteokondüksiyon: Kemik oluşumuna destek veya iskelet görevi gören fiziksel bir etkidir. Daha çok alloplastik kemik greftlerinde görülür. Histolojik incelemelerde periodontal rejenerasyona katkısının sınırlı olduğu görülmüştür. Kemik grefti yeni kemik doku oluşumunu sağlamaz. Greftte dışarıdaki hücreler penetre olur ve kemik rejenerasyonu gerçekleşir [40].

Rejeneratif periodontal tedavide kullanılan çeşitli kemik greftleri vardır. Bunlar kişinin kendisinden (otogreftler), başka kişiden (allogreftler), farklı bir türden (zenogreftler) ve alloplastik maddelerden elde edilen greftler olmak üzere sınıflandırılabilir [41].

2.3.1.1. Otogreftler

Kişinin bir bölgesinden alınıp başka bir bölgesine yerleştirilen, canlı osteoblast ve öncül kemik hücrelerini içeren greftlerdir [45]. Hem osteojenik hem de osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahip olan otolog kemik greftleri kemik rejenerasyonu için ideal bir greft materyalidir [46]. Otogreftlerin en önemli avantajı yeni kemik oluşumunu destekleyecek canlı hücreler içermesi ve immünolojik tepkiye neden olmamasıdır. Bunun dışında; erken revaskülerizasyon, düşük maliyet, alıcı sahada antijenik etki yaratmaması,

uygulama ve iyileşme açısından diğer greftlere göre daha üstün özellikler taşımaları otogreftlerin diğer önemli avantajları arasında yer almaktadır [47]. Gereksinimi karşılayacak kadar kemik grefti bulunamaması, hastanın yaşı ve sistemik durumunun uygun olmaması, ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesi, verici sahada gelişebilen kanama, enfeksiyon ve kronik ağrı ve genel anestezi zorunluluğu bu tür greftlerin en önemli dezavantajları arasında yer almaktadır [16]. Otogreftler, kortikal kemik, süngerimsi kemik ve kemik iliğinden elde edilir. Ağız içi (intraoral) veya ağız dışı (ekstraoral) bölgeler otogreftlerin eldesi için başlıca kaynaklardır [40].

2.3.1.1.1. Intraoral Otogreftler

İyileşen çekim bölgeleri, dişsiz bölgeler, maksiller tüber bölgesi ve mandibular retromolar bölge ağızdaki başlıca otolog kemik grefti kaynaklarıdır. Kortikal kemik parçaları, osseöz koagulum, intraoral kansellöz kemik ve kemik karışımı intraoral otolog greft materyalleri olarak kullanılmaktadır. **Kortikal kemik parçaları** osteoplasti veya osteokomi işlemleri sırasında elde edilir. **Osseöz koagulum**, kortikal kemik parçaları ile hastanın kanının karıştırılması sonucunda elde edilir. Elde edilen greft malzemesi doğrudan kemik hasarı içerisine yerleştirilir. Geniş hasarlar için yeterli miktarda kemiğin sağlanamaması ve partikül büyüklüğünün ayarlanamaması bu yöntemde karşılaşılan en önemli problemlerdir. **Kemik karışımı**, hastadan alınan kortikal ya da kansellöz kemiğin amalgam kapsüle konarak 100-200 µm boyutunda partiküller elde edecek şekilde öğütülmesi sonucunda oluşur. Maksiller tüber bölgesinden, dişsiz bölgelerden ve iyileşen çekim bölgesi boşluklarından alınan **intraoral kansellöz kemik**, çekimden 8-12 hafta sonra elde edilmelidir. Maksiller tüber bölgesi fazla miktarda kansellöz kemik içermektedir [40].

2.3.1.1.2. Ekstraoral Otogreftler

Aynı bireyin vücudunun farklı bölgelerinden alınıp ağız içi kemik defektlerinde kullanılan ekstraoral otogreftler genellikle iliak kemik, kemik iliği ya da kaval kemiğinden elde edilirler [48]. İliak kemik kortikal ve kansellöz kemik potansiyeline sahiptir. Kansellöz kemik greftleri az sayıda osteoblast içermelerine rağmen, osteojenik etkiyi sağlayacak öncül hücreler içermektedirler. Bu greftlerin bilinen tek dezavantajı gereken mekanik dayanımı sağlayamamalarıdır. Kortikal greftler ise dayanıklı ve sert bir yapı oluştururken, osteogenezi artırıcı yetenekleri yoktur. Kortikal kemikler hasarlı bölgeye yerleştirildikten sonra 6 haftaya kadar güçlü bir mekanik destek sağlarlar [49].

2.3.1.2. Allogreftler

Aynı türün genetik olarak birbirinden farklı olan bireylerinden elde edilen kemik allogreftleri doku bankalarından ticari olarak sağlanabilir [48]. Doku bankaları kemik allogreftlerinin kullanımı konusunda bazı benzer tescilli tekniklerde farklı metotlar uygulamalarına rağmen benzer hazırlama, temizleme, dekontaminasyon, antimikrobiyal uygulama, dehidratasyon, greft büyüklüğü ve ana sterilizasyon gibi temel hazırlama prensipleri kullanmaktadırlar [50]. Bu greft materyalleri yüksek başarı oranına sahiptirler ve hastada ikinci bir cerrahi müdahale gerektirmezler. İmmünolojik tepki ve transplantasyon sonrasında greft materyalinden hastaya patojenlerin bulaşma riski allogreftlerin en önemli dezavantajlarından [51]. Dondurma, dondurarak kurutma, radyasyon, sterilizasyon, tamamen ya da yüzey dekalsifikasyonu ile allogreftlerdeki antijenite riski ortadan kaldırılır. Bu işlemler greft materyalinde bulunan canlı kemik hücrelerini öldürerek antijeniteyi önemli ölçüde azaltır, böylelikle kemik greftlerinin güvenli ve steril bir şekilde saklanmasına olanak sağlar [52]. Tabii tutuldukları işleme göre osteokondüktif veya osteoindüktif olabilirler. Allogreftler immünojenite, viral partiküller, bakteriler ve kötü huylu hücrelerin bulaşması açısından daha güvenli olmak amacıyla etilen oksit ya da gama radyasyonu ile muamele edilebilirler. Bu işlemler allogreftlerin yapısal dayanımını ve osteoindüktif özelliğini azaltırlar. Gama radyasyonu daha çok greft materyalinin mekanik dayanımını etkilerken, etilen oksit muamelesi daha çok osteoindüktif özelliğini etkiler.

Dondurulmuş allogreftler temel olarak dondurma işlemiyle hazırlanırken, dondurularak kurutulmuş kemik greftleri dondurma işleminden sonra, kemikte bulunan su miktarının % 95'inden fazlasının uzaklaştırılmasıyla hazırlanır. Dondurulmuş allogreftlerin raf ömrü dondurularak kurutulmuş allogreftlere göre daha kısadır. Dondurularak kurutulmuş allogreftler sınırsız raf ömrüne sahipken, dondurulmuş allogreftlerin raf ömrü uygun koşullarda saklandığında maksimum 5 yıldır. Dondurularak kurutulmuş allogreftlerin dezavantajları arasında dondurulmuş allogreftlere göre daha az yapısal dayanıma ve osteoindüktif etkiye sahip olmaları yer almaktadır.

Allogreftler kortikal, kansellöz ve kortikokansellöz greft materyali olarak bulunabilirler. Kansellöz kemiğe göre daha az antijenik özellik göstermesi ve daha fazla miktarda indükleyici protein içermesi sebebiyle kortikal kemik allogreft malzemesi olarak daha çok tercih edilir. Gerekli durumlarda özel olarak şekillendirilebilen allogreftler genel olarak toz ya da partikül formunda şekillendirilirler [49].

Allogreftlerin en yaygın olarak kullanılan formları dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (Freeze-dried bone allograft, FDBA) ve dekalsifiye dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (Decalcified freeze-dried bone allograft, DFDBA)'dir. Dekalsifiye edilen kemik greftleri, FDBA'ne göre daha hızlı bozunurken, diğer yandan doku iskelesi olarak daha az etkilidirler [48].

2.3.1.2.1. Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allogreftleri

Dondurularak kurutulmuş kemik allogreftleri osteokondüktif etki gösterirler. Belirli bir süre sonunda greft materyali bozularak oluşan yeni kemik ile yer değiştirir. Mineral içerdikleri için daha iyi fiziksel özelliklere sahiptirler ancak osteoindüktif etki göstermezler. Klinikte yaygın bir kullanım potansiyeline sahip olan FDBA'ne dair bugüne kadar herhangi bir virüs kontaminasyonuna ya da FDBA'den kaynaklanan patolojik bir bulguya rastlanmamıştır [53]. Dondurularak kurutulmuş kemik allogreftleri klinikte kemik hasarlarının doldurulmasında ve onarılmasında yaygın olarak kullanılırlar. Kemik allogreftindeki immünolojik etkiyi canlı hücreleri öldürerek yok eden dondurarak kurutma işlemi kemiğin yapısal ve biyokimyasal özelliklerini etkilemez [54], ancak bu şekilde hazırlanan greftler zayıf mekanik dayanım gösterirler [55].

2.3.1.2.2. Dekalsifiye Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allogreftleri

DFDBA'leri osteokondüktif özelliklerine ek olarak osteoindüktif özellik de gösterirler. Bu nedenle, iyi bir şekilde damarlanmaya sahip kemiğe yerleştirildiklerinde mezenkimal hücrelerin göç etmelerine, yapışmalarına ve kemik dokuyu oluşturmalarına olanak sağlarlar ve endokondral kemik oluşumunu uyarırlar [51]. Demineralizasyon işlemi hidroklorik asit ile gerçekleştirilir böylelikle, kemik matrisinde bulunan kemik oluşumunu uyaran proteinlerin açığa çıkması sağlanır. Kemik oluşumunu uyaran bu proteinler asidik polipeptid gruplarını içeren kemik morfojenik proteinleridir (BMP) [26].

2.3.1.3. Zenogreftler

Zenogreftler farklı türlerden elde edilen kemik greftleridir. Sığır kökenli kemik ve doğal mercan klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ve ticari ürün olarak (Çizelge 2.1) piyasada mevcut bulunan zenogreft çeşitleridir. Sığır kökenli kemik greftleri insan kemiğinin mineral içeriğine ve mikroyapısına benzer özellikler göstermektedir. Bu greftler gözenekli ve proteinlerinden arındırılmış sığır kemik minerallerinden elde edilirler. Sığır

kökenli kemik greftlerinin periodontal rejenerasyonu desteklediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Mercanların dış iskeletinde bulunan kalsiyum karbonat hidrotermal değişimle hidroksiapatit'e (HA) dönüştürülür. Yapılan çalışmalar mercan kökenli biyomimetik matrislerin kemik oluşumunu desteklediği yönündedir [44].

2.3.1.4. Alloplastlar

Alloplastlar biyouyumlu, inorganik sentetik kemik greft materyalleridir. Seramikler ve polimerler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Alloplastların bileşimleri, morfolojileri ve yüzey özellikleri osteokondüktif özellik sağlayarak greft materyalinin yüzeyi boyunca kemik oluşmasına olanak tanırırlar. Kalsiyum fosfatlar (trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit), kalsiyum sülfat ve biyoaktif camlar gibi seramik bazlı kemik greft malzemeleri kemik ve periodontal rejenerasyonda yaygın olarak kullanılırlar. Doğal ve sentetik polimerler daha çok yönlendirilmiş doku rejenerasyonu yönteminde bariyer membran malzemesi olarak kullanılmaktadırlar [44].

Çizelge 2.1. Ticari kemik greftleri [43]

Greft materyalleri	Ticari isim
Otolog kemik greftleri	
Ağız içi otogreftler	-
Ağız dışı otogreftler	-
Allogreftler	
Dondurularak kurutulmuş kemik allogreftleri	Grafton [®] (Osteotech, Eatontown, NJ, ABD), Lifenet [®] (LifeNet Health Inc., Virginia Beach, VA, ABD)
Dekalsifiye dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti	Transplant Foundation [®] (Transplant Foundation Inc., Miami, FL, ABD)
Zenogreftler	
Sığır mineral matrisi	Bio-Oss [®] (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, İsviçre), OsteoGraf [®] (Dentsply, Tulsa, OK, ABD), Pep-Gen P-15 [®] (Dentsply GmbH, Mannheim, Almanya)
Mercan kökenli kalsiyum karbonat	Biocoral [®] (Biocoral Inc., La Garenne Colombes, Fransa)
Alloplastlar	
Hidroksiapatit (yoğun, gözenekli, biyobozunur)	Osteogen [®] (Impladent Ltd, Holliswood, NY, ABD)
Beta trikalsiyum fosfat	Synthograph [®] (Bicon, Boston, MA, ABD), alpha-BSM [®] (Etex Corp., Cambridge, MA, ABD)
Biyoaktif camlar (SiO ₂ , CaO, Na ₂ O, P ₂ O ₅)	PerioGlas [®] (Novabone, Jacksonville, FL, ABD), BioGran [®] (Biomet 3i, Palm Beach Gardens, FL, ABD)

İnsan ve hayvan deneyleriyle elde edilen histolojik bulgular kemik grefti uygulamalarının yeni bağlantı dokularının oluşumu yerine uzun bağlantı epitellerinin oluşumuyla sonuçlandığı yönündedir. Bu nedenle yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur [43].

2.4. Yönlendirilmiş Doku/Kemik Rejenerasyonu

Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ilk olarak 1950'li yıllarda, omurgadaki kemik kaynaşması sırasında yumuşak dokuların rolünü araştırmak amacı ile doku sıvılarına karşı geçirgenlik gösteren bariyer membranı kullanan Hurley ve Basset tarafından ortaya atılmıştır. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu terimi ise 1980'li yıllarda, diş eti dokusundan ve epitel dokudan hasarlı bölgeye hücre göçünü engellemek amacıyla periodontal iyileşmede bariyer membran kullanan Nyman ve Gottlow tarafından ortaya atılmıştır [56].

Geleneksel tedavi yöntemleri uygulamalarından sonra periodontal rejenerasyonu engelleyen temel nedenin; hasarlı bölgeye, epitel hücrelerin mezenkimal hücrelerden daha hızlı bir şekilde göç etmesi olduğu düşünülmektedir. Hasarlı bölgeye göç eden epitel hücreler uzun bağlantı epitelleri oluşturarak, periodontitis sonucu hasara uğramış kök yüzeyinde yeni bağlantı dokularının oluşmasını ve böylelikle hasarlı bölgede kemik oluşumunu engeller [2, 4,5].

YDR ve YKR yöntemleri, hasarlı bölgeye epitel hücre göçünü engelleyerek periodontal rejenerasyonu gerçekleştirmek amacıyla bariyer olarak görev yapan membranlar kullanılır (Şekil 2.3). Bu teknik osteoblast üremesi ve kemik rejenerasyonu için gerekli süreyi sağlayarak hasarlı bölgede hücrelerin repopüle olmasını destekler [6].



Şekil 2.3. YDR/YKR tekniğinde bariyer membran kullanımı [3]

YDR ve YKR yöntemlerinde kullanılacak olan bariyer membranların periodontal rejenerasyon açısından etkin olabilmesi için bir takım gereksinimleri karşılamaları gerekmektedir. Bariyer membran biyouyumlu ve ikinci bir cerrahi müdahaleyi ortadan kaldırmak amacıyla biyobozunur olmalıdır. Bunlar dışında, membran hasarlı bölgeye yerleştirildikten sonra membranın hareket etmesini önlemek amacıyla membran ile çevre dokular arasında uygun bir yapışma olmalı ve kolay bir şekilde manipüle edilebilmelidir. Membranların sahip olmaları gereken bir diğer özellik de yeterli mekanik dayanımdır [7]. Bariyer membranlar epitel hücre göçünü engellemek amacıyla seçici geçirgen olmalı ancak oksijen ve besin maddelerinin geçişine engel olmamalıdır [6]. Membranın bozunma hızı yeni doku oluşum hızıyla örtüşmeli ve periodontal rejenerasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için membran en az 4-6 hafta ağız ortamında bulunmalıdır [57].

2.4.1. Bariyer Membran Üretiminde Kullanılan Malzemeler

YDR/YKR yöntemlerinde, çeşitli doğal ve sentetik polimerlerden üretilen bariyer membranlar kullanılmakta ve üretilen membranların periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyelleri araştırılmaktadır [6].

Bariyer membran üretiminde doğru malzemenin seçilmesi son derece önemlidir, çünkü geliştirilen membranın sahip olduğu fiziksel ve mekanik özellikler membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanılıp kullanılmayacağını belirlemektedir. Kullanılan her malzemenin birbirine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. YDR/YKR tekniğinde kullanılan membranlar bozunma özelliklerine göre rezorbe olmayan ve rezorbe olan membranlar olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Piyasada ticari ürün olarak mevcut bulunan bariyer membranlar Çizelge 2.2’de verilmiştir [58].

2.4.1.1. Politetrafloroetilen (PTFE) Membranlar

PTFE membranlar son yıllarda YDR tekniğinde periodontal dokuların rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [59]. Kimyasal ve biyolojik açıdan inert olan PTFE membranlar biyouyumludurlar. Ayrıca, enzimatik ve mikrobiyolojik saldırılara karşı dirençlidirler. PTFE membranlar hasarlı bölgede kemik rejenerasyonunun sağlanması için uygun bir alan oluşturarak, hasarlı dokuların yeniden bütünlüğünün sağlanmasını desteklerler [60].

Geleneksel PTFE membranlara alternatif olarak titanyum ile kuvvetlendirilmiş PTFE membranlar da üretilmektedir. Titanyum ile kuvvetlendirilen bu membranlar geleneksel PTFE membranlarla kıyaslandığında hücre rejenerasyonunu titanyumdan kaynaklanan ekstra mekanik dayanım sayesinde daha fazla desteklemektedirler [3].

PTFE membranların en önemli dezavantajlarından biri rezorbe olmadıklarından dolayı ikinci bir cerrahi müdahale gerektirmeleridir [58]. İkinci bir cerrahi müdahale hastada enfeksiyon riskini arttırmakta aynı zamanda ekonomik ve psikolojik sıkıntılara da neden olmaktadır. Ayrıca, membranın uzaklaştırılması sırasında, oluşan yeni periodontal dokular hasar görebilmektedir [61]. Hasar gören periodontal dokuların sürekli bir şekilde iyileşebilmesi ve ikinci bir cerrahi müdahalenin elimine edilmesi amacıyla bariyer membranlar biyobozunur özellikte olmalıdır [62].

2.4.1.2. Kollajen Membranlar

Kollajen YDR uygulamalarında yaygın olarak kullanılan doğal bir biyomalzemedir. Kollajen membranlar mükemmel bir hücre afinitesine ve biyouyumluluğa sahiptirler [63]. Ekstrasellüler matriksin temel bileşeni olan kollajen hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere doğrudan bağlanmasına izin veren aminoasit reseptörleri aracılığıyla osteoblast üremesini destekler [64].

Kollajen membranlarda karşılaşılan en büyük problemlerden bir tanesi membran manipülasyonunun, membranın zayıf mekanik dayanımından dolayı zor olmasıdır [59]. Kollajen membranlar hayvanlar ya da insanlardan izole edildikleri için hastalık taşıma riskine sahiptirler, ayrıca hızlı bir şekilde bozunmaları klinikteki kullanımlarını kısıtlamaktadır [56, 65]. Kollajen membranların stabilitesi ve mekanik özellikleri ultraviyole (UV) ışınması, genipin (Gp), gluteraldehit ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) gibi fiziksel ve kimyasal çapraz bağlayıcılarla artırılabilir [3].

2.4.1.3. Sentetik Polimerlerden Üretilen Membranlar

YDR/YKR yöntemlerinde çeşitli sentetik polimerlerden üretilen membranlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik polimerler kendi doğal hallerindeyken hücre tanıma bölgeleri açısından eksik olmalarına rağmen, kontrol edilebilir ve tekrar üretilebilir kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler [66].

Poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), poli-ε-kaprolakton (PCL) ve bunların kopolimerleri bariyer membran üretiminde kullanılan başlıca sentetik polimerlerdir [67]. Bu polimerler düşük immünojenisiteye ve toksik olmayan özelliklere sahiptirler. Ayrıca, biyouyumlu ve biyobozunurdurlar. İstenilen şekle uygun olarak kolayca işlenebilirler ve kimyasal, fiziksel ve bozunma süreleri uygulamaya bağlı olarak istenilen özellikleri karşılayacak şekilde ayarlanabilir [68]. Sentetik polimerlerden üretilen membranların *in vivo*'daki manipüle edilebilirlikleri PTFE membranlara göre daha fazladır [3]. Ancak, bu polimerlerin membran olarak hücre afiniteleri kollajen membranlara göre zayıftır [59].

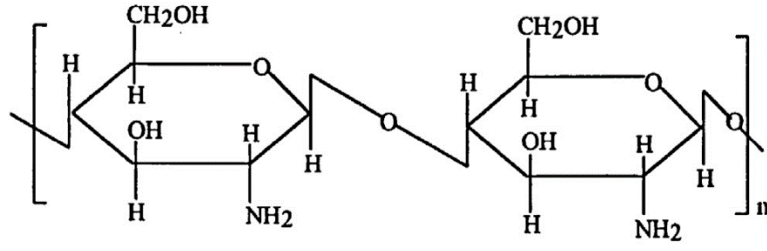
PLA, PGA ve bunların kopolimerleri bozunma sırasında doğrudan asidik ürünlere dönüşürler. Ortamda biriken asidik ürünler ortam pH'ını düşürerek kronik enfeksiyona neden olurlar. PLA ve PGA ile karşılaştırıldığında PCL'in bozunma ürünleri asidik değildir [67,69].

PCL hidrofobik ve yarı kristalin yapıda olan bir polimerdir. PCL'in kristalinitesi artan molekül ağırlığına bağlı olarak azalmaktadır. Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) -60°C iken erime sıcaklığı $59-64^{\circ}\text{C}$ arasında değişmektedir. Bu nedenle PCL düşük sıcaklıklarda kolaylıkla işlenebilmektedir. Ortalama molekül ağırlığı 3,000 ile 80,000 g/mol arasında değişmektedir [70]. Sahip olduğu yüksek mekanik dayanım ve düşük fiyatı nedeniyle PCL biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir biyopolimerdir. PCL'in bozunma hızı oldukça yavaştır. *In vivo*'da bozunma süresi yaklaşık olarak 2 ila 3 yıldır. Bu süre YDR/YKR uygulamaları açısından oldukça uzundur. Ayrıca PCL hücre yapışmasını düşük oranda destekler. Bu gibi nedenlerle PCL diğer polimerlerle karıştırılarak ya da kopolimer halinde kullanılır [67].

Kollajenin hidroliz ürünü olan jelatin sahip olduğu biyouyumluluk, biyobozunurluk ve immünojenik olmayan özellikleri ile doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan doğal bir malzemedir. Ekstrasellüler matriksin temel bileşenlerinden olan jelatin hücre yapışmasını, farklılaşmasını ve üremesini destekler. Jelatinin kullanımını kısıtlayan en önemli özellikleri mekanik dayanımının zayıf olması ve aynı zamanda hızlı bir şekilde bozunmasıdır. PCL üstün mekanik dayanımı ve uzun bozunma süresi göz önüne alındığında PCL ve jelatinden üretilen kompozit doku iskeleleri ve membranlar doku mühendisliği uygulamaları için umut vericidir [67, 71-73].

2.4.1.4. Kitosan Membranlar

Kitosan, kitin'in deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir aminopolisakkarittir. Endüstriyel ölçekte kabuklu deniz canlılarının kabuklarından elde edilir. N-asetil glukozamin ve N-glukozamin birimlerinin bir kopolimeri olan kitosan, doğal bir polimerdir. Kitosanın yapısı Şekil 2.4'de verilmiştir. Deasetilasyonun %100 olmamasına bağlı olarak yapıda asetil grupları (CH_3CO) da bulunmaktadır. Sahip olduğu biyolojik özellikler nedeniyle ortopedik ve periodontal uygulamalarda kemik substitüsyon malzemesi ve membran malzemesi olarak yaygın olarak araştırılmaktadır [8,74,75].



Şekil 2.4. Kitosanın yapısı [8]

Kitosan biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerine sahiptir. Bununla birlikte antibakteriyel, antifungal ve yara iyileştirici gibi özelliklere de sahiptir. Kitosanın bozunma ürünleri toksik, antijenik ve kanserojenik değildir [2].

Kitosan membranlar petrol bazlı sentetik polimerlerden üretilen membranlardan üstün özelliklere sahiptirler. Bunlar arasında kitosanın yenilenebilir kaynaklardan elde edilmesi ve aynı zamanda sulu ortama konulduğunda, PLA ve PGA gibi sentetik membranlara göre daha esnek olması yer almaktadır [2, 8].

Kemik doku rejenerasyonunu destekleyen kitosanın en büyük avantajlarından bir tanesi yapısının kemik ekstrasellüler matriksinde bulunan glikozaminoglikanlara benzemesidir. Ayrıca kitosanın sahip olduğu pozitif yüzeysel yükü ve hidrofilik özellikteki yüzeyi hücre yapışmasını, üremesini ve farklılaşmasını desteklemektedir [2, 8].

Kitosan membranlar kollajen membranlarla kıyaslandığında kollajen membranlara göre hem daha ucuzdurlar hem de daha yüksek mekanik dayanıma sahiptirler. Ancak kitosan membranların biyoaktiviteleri kollajen membranlara göre daha düşüktür ve kitosan membranlar kollajen membranlara göre daha fazla kırılabilirler. Kitosan membranların kırılabilir özellik göstermeleri cerrahi operasyon sırasındaki manipülasyonunu zorlaştırmaktadır ve membran ile temas eden yumuşak dokularda açılmaya neden olmaktadır. Tüm bu olumsuzluklar göz önüne alındığında kitosanın kırılabilir doğası klinikteki kullanımını kısıtlamaktadır [7].

Kitosan sahip olduğu özellikler nedeniyle YDR ve YKR yöntemleri için ideal bir membran malzemesi olmasına rağmen, yetersiz mekanik dayanımı ve biyoaktivitesi kemik rejenerasyonunu desteklemesi amacıyla iyileştirilmelidir. Bu amaçla kitosan çeşitli osteojenik mineraller ile bir arada kullanılır. Hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP), silika ve biyoaktif cam gibi inorganik biyoaktif malzemelerle bir arada üretilen kitosan

membranların mekanik dayanımlarının ve osteojenik özelliklerinin saf kitosana göre daha iyi olduğu literatürde yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [8].

2.4.1.5. Seramik Bazlı Malzemeler

Kemik nano boyuttaki biyolojik apatit minerallerden ve kollajen, proteoglikan ve glikoprotein matristen oluşan bir nano kompozittir [76]. Kemiğin kompozit yapısını taklit etmek amacıyla doğal ve sentetik polimerlerden üretilen doku iskeleleri alümina, zirkon, kalsiyum fosfat ve biyocam gibi biyoseramiklerle bir arada kullanılmış ve doku iskelelerinin yapısına katılan biyoaktif seramiklerin doku iskelelerinin osteokondüktif özelliğini arttırdığı belirtilmiştir [77, 78].

Biyoaktif camlar hem *in vitro* hem de *in vivo*'da mükemmel bir biyoaktiviteye ve biyoyumluluğa sahiptirler. Biyoaktif camların biyomineralizasyon yeteneği; bileşimi, partikül boyutu, gözenekliliği, yüzey alanı ve morfolojisi ile ilişkilidir. Son yıllarda, biyoaktif camlar ve seramik malzemeler nano boyutlarda üretilmektedir [2, 79]. Kemiğin yapısında bulunan mineraller nano boyutta olduğundan, nano boyuttaki seramik malzemeler protein absorpsiyonunu ve hücre yapışmasını mikron boyutundaki seramik malzemelere göre daha fazla desteklemektedirler [80]. Biyoaktif camlar alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin ve osteopontin gibi farklılaşma belirteçlerinin miktarını artırarak osteoblastik hücrelerin farklılaşmasını destekler. Doku iskelelerine biyoaktif camların eklenmesi doku iskelesinin sadece biyomineralizasyon kapasitesini arttırmaz aynı zamanda doku iskelesinin mekanik dayanımını da artırır. Biyoaktif camlar, yapılarından salınan çözünür silikon sayesinde hasarlı kemik dokuya yerleştirildiklerinde çevre dokuya kimyasal bağlarla bağlanırlar. Bu yapışma sayesinde bakteri girişi engellenmektedir. Biyoaktif camların elastik modülü çevre dokuların elastik modülü ile uyumlu olduğundan biyoaktif camlar kemik yıkımına neden olmazlar [42].

Yüksek mekanik dayanımı, kimyasal kararlılığı, sertliği ve paslanmaz çelik alaşımlarına benzer elastik modülü göz önüne alındığında zirkon mükemmel bir seramik biyomalzemedir. Zirkon, titanyum kadar biyoyumludur ve sahip olduğu mekanik dayanım sayesinde protez cihazların üretiminde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, osteoblastların zirkon üzerinde çoğalıp farklılaştıkları ve herhangi bir negatif etkinin gözlenmediği belirtilmiştir. Zirkon hem *in vitro* hem de *in vivo*'da herhangi bir sitotoksik ve enflamatuvar etkiye neden olmamaktadır. Ancak, biyo inert bir seramik olduğundan implante edildiğinde çevre doku ile herhangi bir bağ kurmaz [81].

Çizelge 2.2. Ticari bariyer membranlar [3]

Biyobozunurluk	Ticari isim	Bileşimi	Mekanik dayanımı	Bozunma hızı	Biyolojik özellikleri
Biyobozunur olmayan	Cytoplast [®] TXT-200	Yüksek yoğunluklu politetrafloroetilen (d-PTFE)	N/A	Biyobozunur değil	Biyoyumlu
	Cytoplast [®] Ti-250	Titanyum ile güçlendirilmiş yüksek yoğunluklu PTFE	N/A	Biyobozunur değil	Biyoyumlu
Biyobozunur sentetik	Resolut LT [®]	Poli-DL-laktik/ko-glikolik asit	11.7 MPa	5–6 ay	Biyoyumlu
	Vicryl [®]	Poliglaktin 910 Poliglikolik/polilaktik (9:1,ağırlıkça)	N/A	~9 ay	Biyoyumlu
	Atrisorb [®]	Poli-DL-laktik ve çözücü (N-metil-2-pirolidon)	N/A	6-12 ay	Biyoyumlu
Biyobozunur kollajen bazlı	AlloDerm [®]	Ölü insan derisinden izole edilen tip I kollajen	9.4–21.5 MPa	~16 hafta	Biyoyumlu
	Bio-Gide [®]	Domuz derisinden izole edilen kollajen (tip I vetip III)	7.75 MPa	24 hafta	Biyoyumlu
	BioMend Extend [®]	Sığır tendonundan izole edilen tip I kollajen	3.5–22.5 MPa	18 hafta	Biyoyumlu
	Cytoplast [®] RTM	Sığır tendonundan izole edilen tip I kollajen	N/A	26–38 hafta	Biyoyumlu

N/A: bilinmiyor, Cytoplast[®] (Osteogenics Biomedical, Lubbock, TX, ABD); Resolut LT[®] (W.L. Gore & Associates Regenerative Technologies, Newark, DE, ABD); Vicryl[®] (Ethicon Inc., Somerville, NJ, ABD); Atrisorb[®] (Atrix Laboratories Inc., Fort Collins, CO, ABD); AlloDerm[®] (LifeCell, Branchburg, NJ, ABD); Bio-Gide[®] (Osteohealth, Shirley, NY, ABD); BioMend Extend[®] (Zimmer Dental Inc., Warsaw, IN, ABD).

İskelet gelişimi için gerekli bir seramik malzeme olan silika, kemik kalsifikasyonunun erken dönemlerinde rol oynar. Silika eksikliğinin sıçanlarda kafatası deformasyonlarına neden olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Kritik miktarlardaki silikon iyonları, osteoblastlarda bulunan kemik siyalo proteini, kollajen-1, osteokalsin ve osteopontin gibi genlerin üretimini arttırmaktadır [82].

Kalsiyum fosfatlar kemiğin inorganik fazına benzeyen kimyasal yapılarıyla kemik onarımı ve rejenerasyonu için son derece uygun seramiklerdir. *In vivo*'da, yüzeylerinde oluşan kemik benzeri mineral tabakası aracılığıyla kemiğe bağlanırlar [83, 84]. Kalsiyum fosfatlar sahip oldukları biyoyumluluk ve osteokondüktif özellikleriyle klinikte kemik dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Pek çok biyobozunur polimerin yapısına katılan kalsiyum fosfatlar hem polimerin mekanik dayanımını artırırlar hem de protein adsorpsiyonunu artırarak malzemenin osteokondüktif özelliğini artırırlar [85]. HA ve TCP kemik doku mühendisliğinde kullanılan en önemli iki kalsiyum fosfat türevidir [76]. HA'ın vücut ortamındaki çözünme hızı oldukça yavaşken β -TCP'in bozunma hızı son derece yüksektir. Biyobozunurluğu dengeleyerek uygun sonuçlar almak amacıyla HA ve TCP'dan oluşan bifazik kalsiyum fosfat üretimine yönelik çalışmalar mevcuttur [77].

Kalsiyum fosfat seramiklerinin serum proteinlerine bağlanma kapasiteleri diğer malzemelere göre oldukça yüksektir. Proteinler kalsiyum fosfatlara, kalsiyum fosfat yüzeyleri üzerindeki bağlanma bölgeleri olan Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonları üzerinden elektrostatik etkileşimlerle bağlanırlar [86].

Doğal kemiğin yapısındaki minerallere kimyasal ve yapısal açıdan benzerlik gösteren HA sahip olduğu biyoaktiflik, biyoyumluluk, osteokondüktiflik, toksik ve immünolojik olmayan özellikleriyle doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [87, 88]. HA, yüzeyinde kemik benzeri apatitlerin oluşumunu destekler. Polimer matris yapısına katılan HA partikülleri osteoblast yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler. Bu nedenle HA kemik onarımında ve rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılır [89]. HA kemik ve dişin inorganik fazını oluşturmaktadır. Kemiğin yaklaşık olarak %60'ı hidroksiapatitten ve yaklaşık olarak %20'si de kollajen fiberlerden oluşmaktadır [88, 90]. HA doğal olarak dokulardan elde edilebileceği gibi (doğal hidroksiapatit), laboratuvar koşullarında da sentezlenebilir (sentetik hidroksiapatit). Biyolojik HA $\text{M}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ (M: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , K^+ ve X: F_2^- , Cl_2^- , Br_2^- , $(\text{OH})_2$, CO_3^{2-}) kimyasal formülüne sahipken, stokiyometrik HA $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ formülüne sahiptir ve stokiyometrik HA'nın Ca/P oranı

1.67'dir. Doğal kemiğin inorganik bileşeni stokiyometrik olmayan apatit yapısındadır. Biyolojik apatit karbonat içermektedir. Bunun dışında, kalsiyumca eksiktir, stokiyometrik bileşimde değildir ve zayıf kristalin yapıdadır [91,92].

2.4.2. Hidroksiapatit Üretim Yöntemleri

Sulu çözeltilerden çöktürme, sol-jel yöntemi, hidrotermal yöntem, ultrasonik ışımaya, yanma sentezi, çoklu emülsiyon tekniği ve biyomimetik çöktürme yöntemi HA üretiminde kullanılan başlıca tekniklerdir [93]. HA üretiminde kullanılan bu yöntemlerin başarı dereceleri yöntemden yöntem farklılık göstermektedir [77]. Ancak bu yöntemler bazı dezavantajlara sahiptirler. Bunlar arasında reaksiyonların uzun sürede gerçekleşmesi, işlem sırasında kalite kontrolün düşük olması, toksik ve pahalı kimyasalların kullanılması, son ürünün safsızlıklar içermesi ve istenmeyen diğer kalsiyum fosfat türevlerinin oluşması yer almaktadır [94, 95].

2.4.2.1. Biyomimetik Çöktürme Yöntemi

Yapay vücut sıvısı (simulated body fluid, SBF), insan kan plazmasındaki değerlere benzer iyon konsantrasyonları içeren süper doymuş yarı kararlı bir çözeltilerdir [96]. Metaller, seramikler ve polimerler uygun yüzey muamelesi ile bu çözelti içerisine daldırıldığında üzerlerinde apatitik kalsiyum fosfat oluşumunu indüklemektedir [97]. Ti implantların yüzeyi genellikle plazma püskürtme yöntemiyle HA ile kaplanmaktadır. Ancak bu yöntem oldukça yüksek proses sıcaklığı gerektirmektedir. Biyomimetik yöntem implant materyallerinin HA ile kaplanması açısından yüksek sıcaklık gerektirmediğinden son derece uygun bir yöntemdir. Biyomimetik yöntem pH ve sıcaklık açısından ılımlı ortam koşullarına sahiptir, bu nedenle polimerler gibi sıcaklık duyarlı ya da gözenekli implantlar gibi kompleks şekilli malzemelerin kaplanması SBF çözeltisine daldırma ile mümkün olmaktadır [98]. SBF'nin doymuşluk seviyesi nedeniyle içerisine daldırılan materyaller üzerinde kalsiyum fosfat oluşumu 2-3 hafta kadar zaman almaktadır. Çökeltme hızını arttırmak amacıyla kan plazmasındaki iyon konsantrasyonlarının katlarını (n=1.5, 2, 5, 10) içeren çeşitli SBF çözeltileri hazırlanmış bu sayede kaplama süresi 2-6 saatler arasına düşürülmüştür [99].

2.4.2.2. Mikrodalga Teknolojisi ve Mikrodalga Destekli Kalsiyum/Fosfat Sentezi

Mikrodalgaların çeşitli uygulama alanları vardır. Bunlar arasında gıda, metalurji, biyomedikal uygulamalar ve kimya gibi alanlar yer almaktadır [100].

Geleneksel ısıtma yöntemlerinde enerji aktarımı konveksiyon, iletim ve radyasyon mekanizmaları ile gerçekleştirilir. Isı aktarımı sıcaklık farkıyla sağlanır. Isınma öncelikli olarak tepkime kabının yüzeyinde başlar. Sonrasında daha yüksek sıcaklıkta olan yüzeyden kap içerisinde bulunan karışıma ısı aktarımı gerçekleşir. Bu yöntemde kabın yapıldığı malzemenin ısı iletkenliği ve kabın kalınlığı da ısı aktarımını etkilemektedir. Mikrodalga uygulamasında ise ısı üretimi moleküler düzeyde başlar, herhangi bir ısı aktarımı gerçekleşmeden, elektromanyetik enerji doğrudan ısı enerjisine dönüşür. Mikrodalga ışıması malzeme içerisine nüfuz ederek malzemeleri doğrudan ısıtır. Polimer ve seramiklerin ısı iletim kapasiteleri oldukça düşüktür. Mikrodalga ışıması sayesinde polimer ve seramiklerin üretiminde ve işlenmesinde işlem süresi azalmakta, aynı zamanda geleneksel yöntemlere göre ürün kalitesi de artmaktadır [101].

Reaksiyon hızının geleneksel yöntemlere göre daha hızlı olması, reaksiyon veriminin artırılması, temiz ve ucuz bir yöntem olması ayrıca, karışımda seçici ısıtma sağlaması mikrodalga ışımasının sağladığı avantajlar arasında yer almaktadır [102].

HA üretiminde kullanılan geleneksel yöntemler bir takım dezavantajlara sahiptirler. Geleneksel yöntemlerden kaynaklanan dezavantajlar mikrodalga ışıması yöntemiyle giderilerek, daha kısa sürede daha verimli bir şekilde nano boyutlarda inorganik materyaller üretilebilir [103, 104].

Han ve ark. kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ve fosforik asit (H_3PO_4) kullanarak hidrotermal yöntem ile mikrodalga ışımasını birleştirerek nano boyutlarda HA üretmişlerdir. Ca/P oranının ve uygulanan mikrodalga gücünün, üretilen HA partiküllerinin özelliklerini etkilediğini belirtmişlerdir [105].

Cao ve ark. kalsiyum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve tri-sodyum fosfat undeka hidrat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) kullanarak mikrodalga desteğiyle HA üretmişlerdir. Mikrodalga yönteminin üstünlüğünü kanıtlamak amacıyla konvansiyonel yöntemle de HA üretmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda mikrodalga yöntemiyle üretilen HA'nın yüksek kristalin yapıda, konvansiyonel yöntemle üretilen HA'nın ise zayıf kristalin yapıda olduğu belirtilmiştir [106].

Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda da 10XSBF çözeltsinden mikrodalga desteği ile HA üretilmiştir. Mikrodalga uygulamasının etkisini görmek amacıyla konvansiyonel yöntemle de HA üretilmiştir. Optimize edilen koşullarda (mikrodalga uygulama süresi ve gücü) kemik benzeri amorf yapıda HA partikülleri elde edilmiştir [92].

2.4.3. Bariyer Membran Üretim Yöntemleri

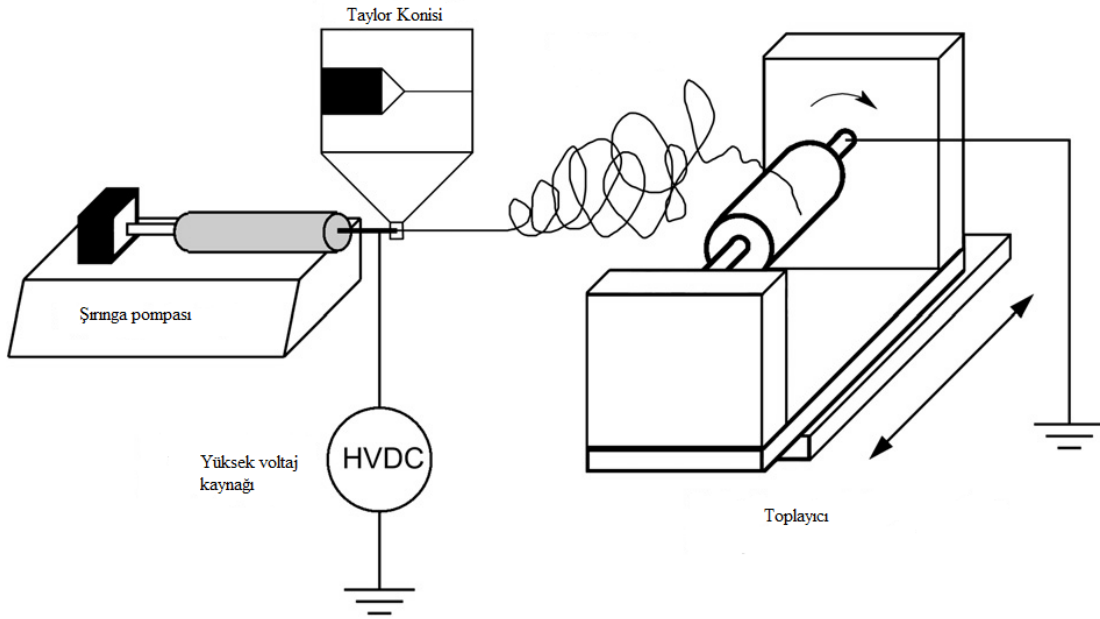
Son yıllarda YDR/YKR yöntemlerinde kullanılmak üzere, pek çok araştırma grubu tarafından doğal ve sentetik polimerlerin bir arada kullanıldığı bariyer membranlar üretilmiştir. Bariyer membran üretiminde genellikle çözücü döküm-partikül uzaklaştırma, dinamik filtrasyon ve elektroegirme yöntemlerinden yararlanılmıştır [3].

2.4.3.1. Çözücü Döküm-Partikül Uzaklaştırma Yöntemi

Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi porojenin gözenek oluşturmak amacıyla polimer çözeltisine eklenmesi ve elde edilen karışımın uygun şekilde kalıba dökülmesidir. Çözücü uzaklandıktan sonra porojen uygun bir çözücüde çözülerek gözenekli membran elde edilir. Porojen boyutu ve eklenen porojenin miktarı değiştirilerek gözenek çapı ve gözeneklilik istenen özellikleri sağlayacak şekilde ayarlanabilir. Bu yöntemin sağladığı avantajlardan biri gözenek şeklinin kontrol edilebilir olması ve birbiriyle bağlantılı gözeneklerin oluşmasıdır. Tüm malzemeler için uygulanabilir olmaması, çözücünün uzun sürede buharlaşması, çözücü uzaklandıktan sonra porojeni uzaklaştırmak için tekrar bir işlem uygulanması ve porojenin tam olarak uzaklaştırılmaması bu yöntemin sahip olduğu dezavantajlar arasında yer almaktadır [107].

2.4.3.2. Elektroegirme Yöntemi

Elektroegirme tekniği elektrostatik kuvvetler kullanılarak polimerlerin fiber yapıda elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu teknikte kapiler bir besleme ünitesinde bulunan polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulanır. Oluşan elektrostatik kuvvetler polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yendiğinde fiber jet formunda akış oluşur. Fiber jet, kapiler ile toplayıcı arasındaki mesafe boyunca hareket ederek çözücünün buharlaşması sağlanır. Böylelikle toplayıcı görevi gören plaka ya da silindir üzerinde fiber yapılar toplanır. Bu yöntem ile mikron ve nano boyutlarda fiberler üretmek mümkündür [108].



Şekil 2.5. Elektroğirme sisteminin şematik gösterimi [109]

Elektroğirme düzeneği, polimer çözeltisini elektriksel yüklerle yükleyen pozitif ya da negatif polariteye sahip yüksek voltaj kaynağından, toplayıcıdan ve çözeltiyi sisteme besleyen şırınga pompasından oluşmaktadır (Şekil 2.5).

Elektroğirme düzeneği oldukça kolay bir kullanıma sahip olmasına rağmen, fiber yapılar elde edebilmek için optimize edilmesi gereken işlem parametreleri vardır. Uygulanan voltaj, polimer çözeltisinin sisteme besleme hızı ve kapiler ile toplayıcı arasındaki mesafe, elde edilen fiberlerin yapısını etkileyen işlem parametreleridir. İşlem parametrelerini optimize ederek boncuk içermeyen fiberler elde etmek mümkündür. İşlem parametrelerinin dışında polimer çözeltisinin konsantrasyonu, çözücünün uçuculuğu ve çözeltinin iletkenliği gibi çözelti özellikleri de fiber oluşumunda ve elde edilen fiberlerin özelliklerinde etkili parametrelerdir [109].

Ekstrasellüler matriks (ECM) dokuların yapısal bütünlüğünü sağlayan nano boyuttaki fiberlerden oluşur. Elektroğirme yöntemi nano boyuttaki fiberlerden oluşan ECM benzeri doku iskelelerinin üretilmesi açısından son derece uygun bir yöntemdir. Bu yöntemle üretilen doku iskeleleri sağladıkları geniş yüzey alanıyla hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve infiltrasyonuna olanak sağlarlar. Elektroğirme yöntemiyle üretilen doku iskeleleri deri doku mühendisliği, kıkırdak doku mühendisliği, kemik doku mühendisliği ve yapay damar üretimi gibi doku mühendisliği uygulamalarında yaygın kullanım potansiyeline sahiptir [12]. PCL, PLA, PGA ve poli(laktid-ko-glikolid) gibi sentetik biyobozunur

polimerlerden ve ipek fibroini, dekstran, kollajen, jelatin ve kitosan gibi doğal polimerlerden elektroğirme yöntemiyle doku iskeleleri üretilmiştir. Doğal ve sentetik polimerler bir arada kullanılarak da elektroğirme yöntemiyle doku iskeleleri başarılı bir şekilde üretilmiştir [110, 111].

Elektroğirme yönteminin yaygın olarak kullanıldığı bir diğer alan da kontrollü ilaç salım uygulamalarıdır. Bu yöntem özellikle sıcaklık duyarlı ilaçların salımı için oldukça uygun bir yöntemdir. Yöntemin sağladığı bir diğer avantaj da ilacın hızlı bir şekilde salınmasını minimize etmektir [112].

2.5. Periodontal Rejenerasyonda Antimikrobiyal Ajanların Kullanılması

Klinikte periodontitisin tedavisine yönelik olarak tetrasiklin, metronidazol, penisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin, siprofloksasin ve makrolidler gibi antibiyotikler sistemik olarak kullanılmaktadır [113].

Metronidazol (1-[2-hidroksietil]-2-metil-5-nitroimidazol) antibakteriyel ve antiprotozoal bir ilaçtır [10]. Klinikte 45 yılı aşkın bir süredir oral hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Metronidazol gram-negatif anaerobik bakterilere karşı etkilidir [11]. Güçlü bakterisid etkiye sahiptir ancak *A. Actinomycescomitans*'in sorumlu tutulduğu olgularda doğru antibiyotik değildir [114].

Periodontitise neden olan bakteriyel flora daima heterojen ve komplekstir. Ayrıca, periodontal hastalığa neden olan mikroorganizma ya da mikroorganizmalar kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Yapılan araştırmalar, periodontal cep içerisinde hastalığa neden olabilecek 500'den fazla mikroorganizma türünün varlığını kanıtlamıştır. Bu nedenle birden çok patojenin neden olduğu periodontal hastalıklarda kombine antibiyotik kullanımı daha uygundur [115]. Periodontal tedavide sistemik olarak uygulanan kombinasyonlar arasında metronidazol ve amoksisilin bulunmaktadır. Bu antibiyotik kombinasyonunun ileri derecede periodontitise sahip hastalarda klinik olarak başarılı olduğu gösterilmiştir. Metronidazol ve amoksisilin kombinasyonu sadece metronidazol ya da sadece amoksisilin uygulamasına göre daha etkilidir [116].

Geleneksel tedavi yöntemlerinde yüksek dozdaki antibiyotikler sistemik olarak salınmaktadır. Sistemik antibiyotik salımı karaciğerde toksik etkilere neden olmaktadır ayrıca, periodontal cep içerisine düşük konsantrasyonda ilaç salınmaktadır. Bu nedenle periodontal rejenerasyonda bölgesel antibiyotik salımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır

[117]. Kontrollü salım sistemleri, ilacı yavaş bir şekilde salarak ilacın kullanılabilirlik süresini arttırmaktadır [118]. Bölgesel antibiyotik salımıyla sadece periodontal hastalığa sahip bölgeye yüksek dozda antibiyotik salınmakta, aynı zamanda bakterilerin ilaca karşı direnç kazanmasının önüne geçilmektedir [119].

2.6. Periodontal Rejenerasyonda Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri

Periodontal dokuların rejenerasyonu hücreler, hormonlar, büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimlerle düzenlenen kompleks çok faktörlü bir prosestir. Platelet-türevli büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve kemik morfojenik proteinleri (BMPs, BMP-2, BMP-3, BMP-6 ve BMP-7) gibi büyüme ve farklılaşma faktörleri periodontal rejenerasyonu destekleyen ve periodontal dokularla ilişkili olan sinyal molekülleridir [39]. Büyüme faktörleri doku onarımı ve rejenerasyonu gibi hücrel olayları düzenleyen doğal proteinlerdir. Büyüme faktörleri hedef hücrelerin hücre membranlarında bulunan spesifik reseptörlere bağlandıktan sonra hücre içi sinyal yolları uyarılır. Buna bağlı olarak hücrel aktiviteleri ve hücre fenotipini değiştiren genler aktif hale gelir. Yapılan çalışmalar, büyüme faktörlerinin hücre üremesi ve farklılaşması gibi bir seri hücrel olayla doku rejenerasyonunu iyileştirdiğini göstermiştir. Ancak çeşitli büyüme faktörlerinin doku rejenerasyonuna olan etkisi birinden diğerine farklılık gösterebilmektedir.

Platelet-türevli büyüme faktörünün periodontal rejenerasyondaki etkinliği kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. PDGF kemik matrisinde bolca bulunan doğal bir proteindir. PDGF'in PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB ve PDGF-CC olarak adlandırılan izomerik formları bulunmaktadır. Son zamanlarda PDGF-DD izomerinin varlığı da kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada PDGF-AA'nın insan fibroblast hücrelerinin yeniden yapılanmasını uyuracak kemotaktik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir. Ancak PDGF-BB osteoblast ve fibroblastların üremesini uyarılmaktadır. PDGF'in tüm izoformları rekombinant insan (rh) formunda mevcuttur. Periodontal kemik hasarı uygulamalarındaki klinik başarısı ve güvenilirliği kanıtlanan rhPDGF-BB FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalar, PDGF'in hasarlı bölgede osteoblast üremesini desteklediğini göstermiştir. Periodontal rejenerasyonun tam anlamıyla gerçekleşebilmesi için osteoblastların yanında gingival fibroblast ve periodontal ligament (PDL) hücrelerinin de çoğalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar PDGF'in gingival fibroblast ve PDL hücrelerinin de proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir.

Literatürde PDGF'in TGF- β , IGF, BMP2 ve enamel matriks türevi (EMD) gibi diğer büyüme faktörleriyle bir arada kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. PDGF'in bu şekilde diğer büyüme faktörleriyle bir arada kullanılması diğer büyüme faktörlerinin tek başına kullanılmasına göre periodontal rejenerasyonu iyileştirmektedir [120].

TGF- β ekstrasellüler matriks üretimini, apoptozu, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek hücresel fonksiyonları düzenler [121]. TGF- β kemik matrisinde bolca bulunur ayrıca TGF- β 1 insan dokularında en yaygın olarak bulunan formudur. TGF- β ve kemik hücreleri, kemik matrisi, kemik düzenleyici hormonlar arasındaki etkileşimler kemik fizyolojisinde düzenleyici rol oynamaktadır [122]. *In vitro* koşullarda TGF- β 1, gingival ve PDL hücrelerine karşı kemotaktik ve mitojenik aktiviteye sahiptirler ayrıca kollajen, fibronektin, tenaskin ve proteoglikanlar gibi ECM bileşenlerinin üretimini düzenlerler. *In vivo* koşullarda ise periodontal rejenerasyonu etkili bir şekilde desteklerler. Yapılan çalışmalar TGF- β 1'in doku oluşumunu desteklediğini belirtmektedir [121].

IGF tek zincirli serum proteinleri ailesindedir. Bu aileye ait IGF-I ve IGF-II olmak üzere iki farklı polipeptid belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda IGF-II'nin kemik oluşumu üzerine ve periodontal ligament ve gingival fibroblast hücreleri üzerine önemli bir etkisi tespit edilmemiştir. Kemik hücreleri IGF üreten ve bu büyüme faktörüne yanıt oluşturan hücrelerdir. Kemik IGF'in inaktif formları için depo görevi görür. IGF pre-osteoblast hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır [123]. IGF-I, PDL hücrelerine karşı kemotaktik etki göstermektedir ayrıca, *in vitro*'da protein sentezini arttırmaktadır. IGF periodontal rejenerasyonda önemli bir rol oynamaktadır [124].

FGF 1974 yılında ineğin hipofiz bezindeki fibroblastların proliferasyon aktivitelerini uyaran bir protein olarak keşfedilmiştir. 1984 yılında ise bazik (bFGF, FGF-2) ve asidik (aFGF, FGF-1) formları keşfedilmiştir. FGF-2'nin periodontal rejenerasyondaki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarla FGF-2'nin fibroblast ve osteoblastların proliferasyonunu desteklediği ve anjiyogenezi arttırdığı kanıtlanmıştır. Ayrıca FGF-2 periodontal rejenerasyon açısından son derece önemli olan PDL hücrelerinin de proliferasyonunu arttırmaktadır [125]. FGF-2 periodontal ligament içerisinde bulunan mezenkimal hücreler üzerinde anjiyojenik ve mitojenik aktivite göstermektedir [126]. Fibroblastik büyüme faktörleri iskelet gelişiminde önemli rol oynarlar. Kemik gelişimi, kemik oluşumu sırasında fibroblastik büyüme faktörlerinin bölgesel olarak salınmasına bağlıdır. Kemikte, FGF-2 mezenkimal hücreler ve

osteoblastlarda FGF-9 ile birlikte bulunur. Doğum sonrası dönemde FGF-2 olgun osteoblastlar tarafından üretilir ve ECM’de depolanır. Fibroblastik büyüme faktörleri kemik oluşumunun yanı sıra osteojenik farklılaşmada da rol oynamaktadır [127].

Büyüme faktörleri *in vivo* koşullarda oldukça kısa yarılanma ömrüne sahiptirler. Bu nedenle literatürde büyüme faktörlerinin çeşitli salım sistemleriyle kontrollü ve bölgesel olarak salınmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır [128]. Chen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada periodontal rejenerasyonda kullanılmak üzere dekstran-ko-jelatin hidrojel mikroküreler üretilmiş ve üretilen mikrokürelerden IGF-I’in kontrollü olarak salımı incelenmiştir [124]. Park ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kitosan süngerler PDGF-BB ile yüklenmiş ve elde edilen sistemin periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyeli incelenmiştir. PDGF-BB’nin kitosan süngerle bir arada kullanılması kemik rejenerasyonunu önemli bir ölçüde desteklemiştir [129].

Kemik morfojenik proteinleri (BMPs) TGF- β ailesine ait, kemik onarımında ve oluşumunda önemli bir rol oynayan proteinlerdir. BMP’ler sıklıkla büyüme faktörü olarak adlandırılmalarına rağmen, hücre göçünde, proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozunda önemli bir role sahip oldukları için BMP’leri farklılaşma faktörü olarak adlandırmak daha doğrudur [39]. BMP’ler son derece osteoindüktif proteinlerdir. Bu nedenle kemik rejenerasyonu için insan ve hayvan modellerde yaygın olarak araştırılmaktadır. BMP ailesinin en etkili üyelerinden olan BMP-2’nin *in vivo* koşullarda kemik oluşumunu uyardığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. BMP-2 klinikte kemik rejenerasyonunu hızlandırmak amacıyla kullanılmaktadır [130]. BMP-7’nin de kemik rejenerasyonu ve kemik oluşumunda son derece etkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Kemik hasarında BMP-2 erken dönemlerde rol oynarken, BMP-7 daha geç dönemlerde rol oynamaktadır. BMP-2 ve BMP-7’nin klinikteki kullanılabilirliği FDA tarafından onaylanmıştır [131].

BMP-6’nın periodontal rejenerasyondaki etkinliğini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır [39]. *In vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda BMP-6’nın BMP-2 ve BMP-4’e göre kemik oluşumunu daha fazla desteklediği, osteokalsin oluşumunu arttırdığı ve osteoblast farklılaşmasını 2-2.5 kat daha fazla desteklediği belirtilmiştir. BMP-6 kemik öncül hücrelerinin erken dönem farklılaşmasında son derece önemli bir rol oynamaktadır ayrıca mezenkimal hücrelerin farklılaşmasında osteoindüktif özellik göstermektedir. *In vivo* koşullarda yapılan çalışmalarda da BMP-6 kemik oluşumunu desteklemektedir. BMP-6’nın

periodontal rejenerasyonu desteklediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [132]. Soran ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, BMP-6 yüklü aljinat mikroküre içeren kitosan doku iskelesinden kontrollü olarak salınan BMP-6'nın kemik iliği kökenli sıçan mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşmasını kitosan ve kitosan/BMP-6 kültür ortamına eklenen gruplara göre daha fazla desteklediği belirtilmiş ve BMP-6'nın periodontal rejenerasyonda etkili olduğu sonucuna varılmıştır [1]. Akman ve ark. tarafından yapılan çalışmada da kitosan doku iskelesinden kontrollü olarak salınan BMP-6'nın MC3T3-E1 hücreleri tarafından sentezlenen ekstrasellüler matriks, alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin (OCN) miktarını kitosan ve kitosan/BMP-6 kültür ortamına eklenen gruplara göre arttırdığı belirtilmiş ve BMP-6'nın osteoblastik hücrelerin hücresel fonksiyonlarını desteklediği sonucuna varılmıştır [133].

2.6.1. Enamel Matriks Türevi

Enamel matriks türevi (EMD) son yıllarda rejeneratif periodontal tedavide kullanılmak üzere ortaya çıkan ve ticari formülasyon olarak piyasada bulunan yeni bir yaklaşımdır. EMD domuz diş tomurcuğundan izole edilen amelogenin ve diğer proteinlerden oluşur. Bu proteinler sementum, periodontal ligament ve alveolar kemik gelişiminde önemlidirler. Domuz ve insanın enamel proteinleri benzerlik göstermektedir çünkü bu proteinler gelişim sırasında değişmeden kalmaktadır [134]. Amelogeninler enamel matriks'in organik fazının %90'dan fazlasını oluşturan hidrofobik proteinlerdir. Enamel matriks proteinlerinin ikinci büyük bileşeni ise enamelinlerdir [135].

EMD'den üretilen tek ticari ürün Emdogain® (Biora AB, Malmö, İsveç) ticari adıyla piyasada mevcuttur. Geliştirilen bu ürün FDA onaylıdır ve periodontal hasarların tedavisinde kullanılmaktadır [135]. Ürün EMD ve taşıyıcı çözelti olan propilen glikol aljinat (PGA) içermektedir. İlk olarak geliştirilen üründe bu iki bileşen kullanımdan önce karıştırılmak zorundaydı. İşlem basamağını azaltarak zaman kaybını önlemek ve yöntemi kolaylaştırmak amacıyla kullanıma hazır formda Emdogain jel geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarla, EMD'in taşıyıcı çözeltisi olan PGA'nın periodontal patojenler üzerinde antimikrobiyal etki yarattığı sonucuna varılmıştır [136].

Histolojik bulgular EMD uygulamasının epitel hücre göçünü kısıtladığı yönündedir. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen pek çok çalışma da bu histolojik bulguları desteklemektedir. EMD, periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır aynı zamanda PDL hücreleri tarafından üretilen protein, kollajen ve mineral oluşumunu da arttırmaktadır. Ancak

PDL hücrelerinin aksine *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda EMD'in epitel hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir [137]. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarla EMD uygulamasının sementoblast ve olgun osteoblastlar üzerinde PDL hücrelerine benzer etki yarattığı sonucuna varılmıştır. *In vivo*'da yapılan çeşitli çalışmalarla EMD'in osteokondüktif ve sementokondüktif özellik gösterdiği ayrıca, kemik oluşumunu desteklediği sonucuna varılmıştır. Klinikte YDR ve EMD yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla hayvan deneyleri yapılmıştır. Hayvanlar üzerinde EMD, YDR ve iki yöntemin kombinasyonu denenmiştir. Yapılan çalışmalarla EMD'in sementum, PDL ve kemik gibi periodontal dokuların rejenerasyonunu desteklediği sonucuna varılmıştır. Ancak YDR yöntemi ile periodontal rejenerasyon daha başarılı bir şekilde sağlanmıştır, ayrıca EMD ve YDR tekniklerinin bir arada kullanılması sadece YDR yönteminin kullanılmasına göre periodontal rejenerasyon açısından herhangi bir üstünlük sağlamamıştır [135].

In vitro koşullarda çeşitli büyüme faktörlerinin PDL, sementoblast ve osteoblastlar hücrelerine etkisi Çizelge 2.3'de özetlenmiştir [138].

Çizelge 2.3. Çeşitli büyüme faktörlerinin *in vitro* koşullarda PDL, sementoblast ve osteoblast hücrelerine etkisi [138]

	PDGF	FGF-2	BMPs	EMD	TGF-β	IGF-1,2
PDL						
Hücre proliferasyonu	++	+++	++	++	-	+
Kemotaksi	++	+++	+	++	0	++
Kollajen sentezi	+	-	+	+	+	+
Matris gen ekspresyonu	++	±	?	+	+	+
Sementoblast						
Hücre proliferasyonu	+++	?	-	++	++	++
Kemotaksi	++	?	?	?	?	?
Kollajen sentezi	+	?	++	++	+	+
Matris gen ekspresyonu	±	?	++	±	±	±
Osteoblast						
Hücre proliferasyonu	++	+++	0	++	+++	++
Kemotaksi	+++	+++	+	++	+++	+
Kollajen sentezi	0	++	0	+	++	+
Matris gen ekspresyonu	±	±	++	±	++	++
Alkelen fosfataz aktivitesi	0	-	++	++	±	0

(-) inhibisyon; (0) etkisi yok; (+) etki; (?) bilinmeyen etki.

2.7. Periodontal Rejenerasyonda İleri Yaklaşımlar

2.7.1. Gen Terapi

Periodontal rejenerasyonda büyüme faktörlerinin bölgesel olarak salınması hasarlı dokuların rejenerasyonu açısından yetersiz kalabilmektedir. Büyüme faktörleri hedef bölgeye salındığında kararsızlaşmakta ve proteolitik olarak bozunabilmektedirler. Diğer bir problem de büyüme faktörlerinin yarılanma ömürlerinin oldukça kısa olmasıdır. Kısa yarılanma ömürlerinden dolayı osteoblast, sementoblast ve PDL hücreleri üzerine etki etme süreleri yeterli olmayabilir. Gen terapi yöntemi ile büyüme faktörlerinin hasarlı bölgedeki biyoyararlılıkları artırılabilir. Genel olarak gen terapi, genetik bilginin hedef hücrelere aktarılması ve böylelikle hücrelerin mevcut hastalığın tedavisi ile ilgili olan proteinleri üretmesidir. Gen transferi retrovirüs, adenovirüs ve adeno-bağlantılı virüsler gibi viral vektörlerle ya da plasmid ve DNA polimer kompleksleri gibi viral olmayan vektörlerle gerçekleştirilir. Periodontal hasara sahip bölgeye büyüme faktörlerinin kodlayan genlerin iletilmesi için pek çok gen transfer yöntemi mevcuttur [139]. Periodontal rejenerasyon için en umut vaat eden gen terapi yöntemi çıplak DNA'nın biyobozunur bir taşıyıcı ile bir arada kullanılmasıdır. Bu yaklaşımda, gen ile aktive edilmiş matris (GAM) kullanılır. GAM *in vivo*'da çıplak DNA'nın taşınmasını ve hasarlı bölgeye iletilmesini sağlar [138].

Zhang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kitosan ve kollajenden oluşan kompozit bir membran üretilmiş ve membranlar insan TGF- β 1 kodlayan plasmid ve adenoviral vektörlerle yüklenmiştir. Vektörlerle yüklü iskeleler üzerinde insan periodontal ligament hücreleri kültüre edilmiştir. Adenoviral TGF- β 1 yüklü iskelelerde daha yüksek proliferasyon hızına ve daha yüksek tip I ve tip III kollajen sentezine rastlanmıştır [121]. Yapılan bir diğer çalışmada kitosan/mercan kompozit membranlar PDGFB kodlayan plasmidler ile yüklenmiştir. İskeleler üzerinde insan periodontal ligament hücreleri kültüre edilmiş ve sadece mercan iskeleye göre gen ile aktive edilmiş iskelelerde daha yüksek proliferasyon hızına ve daha yüksek oranda tip I kollajen sentezine rastlanmıştır [140]. Bu çalışmalar dışında literatürde periodontal rejenerasyonu gerçekleştirmek amacıyla BMP-2, BMP-7 ya da hem BMP-2 hem de BMP-7, FGF-2 gibi büyüme faktörlerini kodlayan çalışmalar mevcuttur [141].

Gen terapi, hücre terapi yönteminden daha avantajlıdır, çünkü gen terapi yönteminde hücre transplantasyonu ve laboratuvar koşullarında hücre kültür çalışmalarına gerek yoktur. Bu nedenle gene terapi hücre bazlı terapilerden daha güvenilir ve daha düşük maliyetlidir. Ayrıca büyüme faktörlerinin doğrudan hasarlı bölgeye uygulanmasıyla karşılaştırıldığında

hasarlı bölgeye birden fazla genin, faktörün gönderilebilmesine olanak sağladığından dolayı periodontal doku oluşum prosesinin orijinal doğasını daha çok taklit eder [141].

2.7.2. Kök Hücreler

Periodontal rejenerasyonu gerçekleştirmek amacıyla kullanılan kemik greftleri, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, EMD gibi yöntemler periodontal ligament dokusunda bulunan iç kaynaklı kök hücrelerin periodontiumu oluşturan fibroblast, sementoblast ve osteoblast hücrelerine farklılaşmasına bağlıdır. Ancak yaş ilerledikçe periodontal ligament hücrelerinin proliferasyon ve mineral oluşturma kapasiteleri azalmaktadır. Bu nedenle başka dokulardan elde edilen kök hücrelerin hasarlı bölgeye transplante edilerek hasarlı bölgede periodontal rejenerasyonu desteklemesi son derece önemlidir [142].

Periodontal rejenerasyonda kullanılan kök hücreler genel olarak diş kaynaklı kök hücreler ve diş kaynaklı olmayan kök hücreler olarak üzere ikiye ayrılırlar. Diş kaynaklı kök hücreler dişin farklı bölgelerinden izole edilirler. Bunlar diş pulpasından izole edilen kök hücreler, periodontal ligamentten elde edilen kök hücreler, apikal papilladan izole edilen kök hücreler, diş folikülünden elde edilen kök hücreler ve dişeti dokusundan elde edilen kök hücrelerdir. Diş kaynaklı kök hücreler çekilen dişler, süt dişleri ve cerrahi müdahale sonucu uzaklaştırılan dişetleri gibi tıbbi atıklardan kolaylıkla elde edilebilir. Kemik iliğinden izole edilen kök hücreler (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSCs) ve yağ dokusundan elde edilen kök hücreler (Adipose-derived stem cells, ASCs) periodontal rejenerasyonda kullanılan diş kaynaklı olmayan kök hücrelerdir. BMMSCs periodontal rejenerasyonu gerçekleştirmedeki potansiyelinden dolayı yaygın olarak araştırılmaktadır [143]. Yang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada tavşanlarda periodontal hasar oluşturulmuş ve BMMSCs içeren ve kök hücre içermeyen jelatin mikroküreler hasarlı bölgeye yerleştirilmiştir. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla bazı tavşanlara mikroküre yerleştirilmemiştir. Üç hafta sonra tüm gruplarda yeni kemik, sementum ve periodontal ligament hücrelerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak BMMSC içeren mikrokürelerin yerleştirildiği hayvanlarda diğer gruplara göre önemli bir ölçüde daha fazla yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu grupta, periodontal ligament fiberler daha düzgün bir şekilde yönlendirilmiştir. Sonuç olarak kök hücre uygulaması kemik, sementum ve periodontal ligament hücrelerinin rejenerasyonunu ve bütünlüğünü başarılı bir şekilde desteklemiştir [144].

Hücre bazlı periodontal tedavide, kullanılacak hücre türüne karar verdikten sonra karar verilmesi gereken bir diğer önemli nokta da hücrelerin hasarlı bölgeye nasıl uygulanacağıdır. Hücreleri hasarlı bölgeye iletmek için genel olarak iki yaklaşım mevcuttur. Bunlar hücrelerin biyomalzeme kullanmadan doğrudan hasarlı bölgeye iletilmesi ve hücrelerin biyomalzemeler yardımıyla iletilmesidir. Birinci yaklaşımda; hücre enjeksiyonu, hücre tabaka mühendisliği ve hücre pelletleri gibi yöntemler uygulanır. Hücre enjeksiyonu en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde hücre süspansiyonu sistemik olarak ya da doğrudan dokuya enjekte edilir. Hücre tabaka mühendisliğinde ise sıcaklık duyarlı poli(N-izopropilakrilamid) kültür kapları kullanılarak hücreler ekstrasellüler matriksleriyle birlikte tabaka halinde elde edilirler. Elde edilen bu hücre tabakası doğrudan hasarlı bölgeye yerleştirilir. Hücre pelletleri ya da diğer adıyla mikrodoku yönteminde ise hücre grupları kullanılır. Hücre grupları yapısal ve fonksiyonel olarak yerleştirileceği dokuya benzerlikler göstermektedir. İkinci yaklaşımda ise hücreler, doğal ve sentetik polimerlerden üretilen doku iskeleleri ve mikroküreler yardımıyla hasarlı bölgeye iletilmektedir [143].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışmasında periodontal rejenerasyonda kullanılmak üzere, literatürde mevcut olan ve klinik kullanıma da sunulmuş bulunan bariyer membranlarda karşılaşılan önemli problemleri çözebilecek özgün yaklaşımlarla yeni bir bariyer membran geliştirilmiştir. Bunun için gözenekli kitosan membranlar çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmış, membranların kemik doku ile temas edecek olan gözenekli yüzeyi mikrodalga-destekli biyomimetik yöntem kullanılarak HA ile kaplanmıştır. HA kaplı membran yüzeyleri BMP-6 büyüme faktörü ile zenginleştirilmiştir.

Membranların yumuşak doku ile temas edecek olan kısımları elektroğirme yönteminden faydalanarak PCL fiberler ile kaplanmış ve enfeksiyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla elektroğirme işlemi sırasında PCL yapısına antibakteriyel bir ajan olan metronidazol ilave edilmiştir. Geliştirilen membran yapısal olarak karakterize edilmiştir. *In vitro* metronidazol salım profili elde edilmiş, metronidazol salımının antibakteriyel etkinliği mikrobiyal çalışmalarla belirlenmiştir.

Bariyer membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyeli fibroblastik yapıdaki MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ve epitel yapıdaki Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmaları ile belirlenmiştir.

Bu bölümde sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalara ait ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Kitosan (yüksek molekül ağırlıklı, deasetilasyon derecesi \geq % 85), silika jel (150-250 μ m çap), sodyum hidroksit (NaOH), gliserin (% 84-88), PCL (Mn: 70,000-90,000 g/g-mol), 1,1,1,3,3,3 heksafloroizopropanol (HFIP) (for GC derivatization \geq 99.8%), metronidazol, fosfat tampon çözeltisi tabletleri (PBS, pH 7.4), tavuk yumurta beyazı lizozimi, sodyum azid, red violet LB tuzu, naphthol AS MX-PO₄, gümüş nitrat (AgNO₃) ve Tris-HCL (Molekül ağırlığı: 157.6 g/g-mol) Sigma'dan (Almanya) satın alınmıştır.

Asetik asit (% 100 puriss glacial) Riedel de Haën (ABD) firmasından satın alınmıştır. Yapay vücut sıvısı (Simulated body fluid, SBF) hazırlarken kullanılan tuzlar (Sodyum klorür-NaCl, potasyum klorür-KCl, kalsiyum klorür dihidrat-CaCl₂.2H₂O, magnezyum klorür heksahidrat-MgCl₂.6H₂O ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat-NaH₂PO₄.H₂O), sodyum

bikarbonat (NaHCO_3), kloroform, N,N-dimethylformamid (DMF), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve formalin Merck'den (Almanya) satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmaları için, Minimum Essential Medium- α (α -MEM) (ultra L-glutaminli) ve L-glutamine (200mM) Lonza'dan (İsviçre) satın alınmıştır. Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) (L-glutaminsız), fetal sığır serumu (FBS), Tripsin/EDTA, penisilin-streptomisin, PestoBlue, β -gliserol fosfat, L-askorbik asit ve glutraldehit (%25, hacim/hacim) Sigma'dan (Almanya), heksametildisilazan (HMDS) Merck'den (Almanya), TRIzol ise Invitrogen'den (ABD) temin edilmiştir.

3.2. Gözenekli Kitosan Membranların Hazırlanması

Gözenekli kitosan membranlar çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır. Çözücü buharlaştırma yöntemi, membran üretiminde kullanılacak polimerin uygun bir çözücü içerisindeki çözeltisinin hazırlanması ve elde edilen çözeltinin istenilen formda şekillendirilerek kurutulması temeline dayanmaktadır. Kitosan membranların hazırlanmasında Gümüşderelioğlu ve Agi (2004) tarafından gerçekleştirilen yöntem kullanılmıştır [145]. Kitosan (%1.1, ağırlık/hacim) asetik asit çözeltisinde (%1'lik, hacim/hacim) 24 saat süresince çözülerek kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiye, gözenek oluşturması amacıyla farklı oranlarda silika jel eklenmiştir ve elde edilen karışım 1 saat süresince karıştırılarak silika partiküllerinin çözelti içerisinde homojen bir şekilde dağılımı sağlanmıştır. Karıştırmanın amacı membranda homojen gözenek dağılımının elde edilmesidir. Elde edilen çözelti Petri kaplarına (5 cm çap) dökülerek oda sıcaklığında ($22\pm 2^\circ\text{C}$) kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan membranlar, Petri kaplarından çıkartılarak 2, 6, 12 ve 24 saat süresince 80°C 'lik etüvde (ES 500, Nüve) %5'lik NaOH çözeltisinde (ağırlık/hacim) bekletilmişlerdir. Bu işlem ile membran içerisinde homojen olarak dağılmış bulunan silika partiküllerinin çözünmesi ve böylece homojen gözenek dağılımı sağlanmıştır. Bunun dışında membranın stabilizasyonu sıcaklık etkisi ile arttırılmıştır. NaOH çözeltisinden çıkartılan membranlar nötr yıkama çözeltisi elde edilinceye kadar oda sıcaklığında distile su ile yıkanmıştır.

3.3. Kitosan Membran Yüzeyinin HA ile Kaplanması

Elde edilen membranın Petri kabı ile temas eden yüzeyi gözeneksiz yapıda iken hava ile temas eden yüzeyi gözenekli yapıdadır. Kitosan membranın gözenekli yüzeyi HA ile

kaplanmıştır. Membran yüzeyinin HA ile kaplanması grubumuzdan Kaynak'ın (2012) tez çalışmasında kullanılan mikrodalga-destekli biyomimetik yöntem ile gerçekleştirilmiştir [92]. Öncelikle 10xSBF çözeltisi hazırlanmıştır. 10xSBF benzeri kalsiyum fosfat çözeltisi Maviş ve ark. tarafından belirlenen reçeteye göre hazırlanmıştır [99]. Bunun için Çizelge 3.1'de verilen ilk beş tuz bileşeni 800 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda sırasıyla çözülmüş, daha sonra hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti stok çözelti olarak kullanılmıştır. Stok çözelti oda sıcaklığında ya da +4°C'de uzun süre saklanabilir. Kaplama işlemi yapılacağı zaman 100 mL stok SBF çözeltisine konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde sodyum bikarbonat (NaHCO₃) eklenmiştir.

Kitosan membranın sadece gözenekli yüzeyinin HA ile kaplanması amacıyla 5x5 cm² boyutunda cam plaka kestirilmiş ve yüzeyi çift taraflı köpük bant ile kaplanmıştır. Sonrasında membranın gözenekli yüzeyi üst tarafta kalacak şekilde membran cam plakaya yapıştırılmış, membranın sıvı ortam ve sıcaklık etkisiyle yüzeyden kalkmasını engellemek için membran, kenarlarından plastik ataçlar ile tutturulmuştur.

Kitosan membran öncelikle NaHCO₃ eklenmemiş 100 mL 10xSBF çözeltisi içerisinde vakum etüvünde çöktürülerek içerisindeki havanın alınması ve tüm gözeneklerin SBF ile temas etmesi sağlanmıştır. Bu işlemden sonra membran NaHCO₃ ilave edilmiş 100 mL 10xSBF çözeltisine aktarılmış ve optimize edilen koşullarda (600 W, 30sx9 tekrar) mikrodalga (StartSynth, Milestone, İtalya) yardımıyla yüzeyin HA ile kaplanması sağlanmıştır. Optimize edilen koşullarda kemiğe en yakın bileşimdeki HA yapısı elde edilmektedir.

Yüzeyde yeterli kaplama elde edebilmek için her seferinde taze SBF ortamında kaplamaya devam edilerek 4 kez kaplama gerçekleştirilmiştir. Her bir kaplama arasında membran yüzeyinde oluşan istenmeyen fazların uzaklaştırılması amacıyla 1 dk distile su ile yıkama yapılmıştır. Son kaplamadan sonra membran sırasıyla 10 dk etanol, 10 dk distile su ile yıkanmıştır. -20°C'de tutulan membran dondurarak kurutma cihazında (Christ, Almanya) kurutulmuştur.

3.4. Membranın Gliserin Çözeltisi ile Muamele Edilmesi

Dondurarak kurutma işleminden sonra membran 30 dk %20'lik (hacim/hacim) gliserin çözeltisinde bekletilmiş ve gliserin muamelesi sonrasında oda sıcaklığında kurumaya

bırakılmıştır. Bu uygulama ile kitosanın kırılabilirliği giderilerek hem *in vitro* hem de *in vivo*'daki manipüle edilebilirliği kolaylaştırılmıştır.

Çizelge 3.1. 10xSBF benzeri çözelti reçetesi

Bileşenler	Ekleme sırası	Miktar (g)	Konsantrasyon (mM)
NaCl	1	58.443	1000.00
KCl	2	0.373	5.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	3	3.675	25.00
MgCl ₂ .6H ₂ O	4	1.016	5.00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	0.250	3.62
NaHCO ₃	6	0.084	10.00

3.5. Kitosan Membrana BMP-6 Yüklenmesi

BMP-6'nın periodontal rejenerasyondaki etkinliği ve doku iskelelerine yüklenerek osteoblastik hücrelerin işlevlerini desteklediği grubumuzca yapılan çalışmalar kapsamında gösterilip literatürde yerini almıştır [1, 133]. HA kaplı membran yüzeyine BMP-6 (recombinant human, R&D Systems, Minneapolis, MN, ABD) yüklenmesi HA ve BMP-6 molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimden yararlanılarak emdirme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 2.5 µg BMP-6 % 0.1 (ağırlık/hacim) sığır serum albümini (BSA) içeren 750 µL PBS içerisinde çözülmüştür. Elde edilen çözülden, membrana yüklenecek BMP-6 miktarı 100 ng olacak şekilde 30 µL alınmış ve mikropipet yardımıyla HA kaplı membran yüzeyine damlatılarak yükleme işlemi tamamlanmıştır. Sonrasında membranlar 37°C'de CO₂ (%5) inkübatöründe (Heraus Instruments, Almanya) bir gün bekletilmiştir.

3.6. Kitosan Membranın Elektroğirme Yöntemi ile PCL Nanofiberler ile Kaplanması

Membranın gözeneksiz, düz yüzeyi elektroğirme yöntemi kullanılarak PCL fiberler ile kaplanmıştır. PCL çözeltisi, PCL'in (%11 ağırlık/hacim) HFIP içerisinde 24 saat süresince karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti elektroğirme düzeneğindeki pompalı şırıngaya yerleştirilmiş ve optimize edilen koşullarda membran yüzeyi 3 ve 7 dk süresince PCL fiberler ile kaplanmıştır. Şırınga ucu ile toplayıcı arasına 27.5 kV'luk bir voltaj (Gamma High-Voltage Research, FL, ABD) uygulanmış, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 35 cm ve PCL çözeltisinin sisteme besleme hızı saatte 2 mL olarak ayarlanmıştır. Yumuşak

dokudaki inflamasyonu elimine etmek amacıyla PCL yapısına antibakteriyel bir ajan olan metronidazol %5, %10 ve %15 (ağırlıkça) ilave edilmiştir. Yukarıda verilen optimize koşullarda membran yüzeyi metronidazol yüklü PCL fiberler ile kaplanmıştır.

3.7. Geliştirilen Membranın Karakterizasyonu

Geliştirilen membranın karakterizasyonu aşağıda belirtilen analizler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Enerji Dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) analizi

Geliştirilen membranın yüzey ve kesit morfolojisi SEM (Carl-Zeiss EVO 506P) görüntüleri ile incelenmiştir. Membranlar, görüntüleme öncesi altın-palladyum ile kaplanmıştır. Membran kalınlığı, ortalama gözenek çapı ve ortalama fiber çapları (n=100) SEM fotoğraflarından Image J (NIH, Bethesda, MD) programı kullanılarak belirlenmiştir. Membran yüzeyindeki HA kaplamaya ait Ca/P oranı SEM cihazında yapılan EDX (XFlash 3001 SDD-EDS detektörü) analizi ile hesaplanmıştır.

3.7.2. Şişme Çalışmaları

HA ve PCL ile kaplı kitosan membranın (HA/Ch/PCL) şişme davranışının belirlenmesi amacıyla gravimetrik tayin yöntemi kullanılmıştır. 9 mm çapında kesilen membranlar 37°C'de PBS (pH 7.4) içerisinde bekletilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında PBS ortamından uzaklaştırılan membranların yüzeylerinde biriken fazla PBS filtre kağıdı ile alınmıştır. Hassas terazi ile tartımları yapılan membranlar tekrar PBS ortamına bırakılmıştır. Bu işleme membranlar denge şişme değerine ulaşana kadar devam edilmiştir. Membranların şişme oranları (Q) Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$Q = \frac{(W - W_0)}{W_0} \quad (3.1)$$

Burada, W_0 membranın kuru ağırlığını, W ise t zamanındaki şişmiş ağırlığını ifade etmektedir.

3.7.3. Membran Biyobozunurluğunun İncelenmesi

HA/Ch/PCL membranın bozunurluğu *in vitro* koşullarda incelenmiştir. 9 mm çapında kesilen membranlar % 0.1 (ağırlık/hacim) sodyum azid ve 500 µg/mL tavuk yumurta beyazı

lizozimi içeren 1.5 mL Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) kültür ortamında 3 hafta süresince kültüre edilmişlerdir. İnkübasyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla membranlar lizozim içermeyen ortamda aynı koşullarda ve sürede inkübe edilmiştir. Kültür ortamları haftada bir yenilenmiştir. 1., 4., 7., 14., 21. ve 28. günlerde kültür ortamlarından uzaklaştırılan membranlar dondurarak kurutma cihazında kurutulmuş ve kuru ağırlıkları tartıldıktan sonra tekrar kültür ortamına bırakılmıştır. Tartılan membranların ağırlıkları başlangıç ağırlıklarıyla karşılaştırılmış ve membran bozunurluğu yüzde ağırlık kaybı (% W_L) ile belirlenmiştir. Bunun için Eşitlik 3.2'den yararlanılmıştır.

$$\%W_L = \frac{(W_0 - W)}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Eşitlikteki W₀ membranların başlangıç ağırlıklarını, W ise bozunma sonrasındaki ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.7.4. Mekanik Dayanım Testi

Membranların çekme dayanımları ve kopma uzamaları oda sıcaklığında, Zwick/Roell (Z250, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir. Mekanik dayanım testi için membranlar 20 mm uzunluğunda ve 5 mm eninde şeritler halinde hazırlanmıştır. Testlerde HA kaplı kitosan membran (HA/Ch) ve HA/Ch/PCL olmak üzere 2 farklı membran kullanılmış, membranların mekanik dayanımları hem kuru hem de ıslak koşullarda incelenmiştir. Islak halde yapılan test için membranlar 1 saat önce 37°C'de PBS (pH 7.4) içerisinde bekletilmiştir. Çekme hızı 10 mm/dk olarak belirlenmiş ve çekme işlemi örneklerde kopma meydana gelene kadar devam ettirilmiştir. Çekme işlemi öncesinde membranların boyları ve genişlikleri dijital verniyeli kumpas ile kalınlıkları ise dijital mikrometre ile ölçülmüştür.

3.7.5. Temas Açısı Ölçümü

Membran yüzeylerinin hidrofilisitesi temas açısı ölçüm cihazı (Krüss DSA 100 Drop Shape Analyzer) ile belirlenmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen analizde, HA/Ch/PCL membran ve HA-Mz içeren PCL fiberler ile kaplı kitosan membran (HA/Ch/PCL/Mz) olmak üzere iki farklı membran kullanılmıştır. Damlalar membran yüzeyinde rastgele noktalara damlatılmış ve farklı noktalardan alınan ölçümlerin ortalaması alınarak temas açısı hesaplanmıştır.

3.8. Metronidazol Salımı

2x2 cm² boyutlarında kesilen HA/Ch membranların gözeneksiz yüzeyleri optimize edilen koşullarda % 5, 10 ve 15 (ağırlıkça) metronidazol içeren PCL fiberler ile kaplanmıştır. Membranlardan metronidazol salımı 37°C’de, % 0.1 (ağırlık/hacim) sodyum azid içeren 4mL PBS (pH 7.4) ortamında *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında ortamlardan 2 µL alınmış ve salım kinetiği nanodrop (Thermo Scientific, 2000c) ile 319 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Elde edilen UV absorbans değerleri, aynı ortamda hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla metronidazol konsantrasyonuna çevrilmiş ve kümülatif salım verileri elde edilerek salım profilleri oluşturulmuştur.

3.9. Antibakteriyel Etkinlik

Metronidazol salımının antibakteriyel etkinliği Refik Saydam Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu’ndan (RSKK) temin edilen *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*, ATCC 25285, gram negatif, zorunlu anaerob), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*, ATCC 29667, gram pozitif, mikroaerofil), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923, gram pozitif, fakültatif anaerob) ve *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922, gram negatif, fakültatif anaerob) standart bakteri suşları ile belirlenmiştir. Antibakteriyel etkinliğin belirlenmesinde %5, 10 ve 15 (ağırlıkça) metronidazol içeren PCL fiberler ile kaplı membranlar (6 mm) ve kontrol grubu oluşturmak amacıyla PCL fiberler ile kaplı membranlar (6 mm) kullanılmıştır. Ayrıca ticari ürün olarak satın alınan metronidazol diskin (5 µg/ 6mm disk, Bioanalyse, Türkiye) de antibakteriyel etkinliği incelenmiştir. Pozitif kontrol grupları oluşturmak amacıyla penisilin (10 mg/6 mm disk BD, ABD), ampisilin (10 mg/6 mm disk BD, ABD), eritromisin (15 mg/6 mm disk BD, ABD), moksifloksasin (5 mg/6 mm disk BD, ABD), doksisisiklin (30 mg/6 mm disk BD, ABD), klindamisin (2 mg/6 mm disk BD, ABD), amoksisilin klavulanik asit (30 mg/6 mm disk BD, ABD) ve gentamisin (10 mg/6 mm disk BD, ABD) standart antibiyotiklerinin bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği incelenmiştir.

Suşlar nutrient brass ortamında 37°C’de çoğaltıldıktan sonra *B. fragilis* %5 (hacim/hacim) vitamin K ve koyun kanı ile zenginleştirilen Schaedler agara, *S. sanguinis* %5 (hacim/hacim) koyun kanı içeren Columbia agara, *S. aureus* ve *E. coli* ise Muller Hilton agara Mc Farland 0.5’e eşit olacak miktarda ekilmiştir. Ekilecek olan bakteri miktarı fotometre (BD, ABD) ile

ölçülmüştür. İnhibisyon çapları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kurallarına göre ölçülmüştür.

3.10. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında, fibroblastik yapıdaki MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ve epitel yapıdaki Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) hücreleri olmak üzere 2 farklı hücre hattı kullanılmıştır.

3.10.1. MC3T3-E1 Preosteoblast Hücreleri ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışması

3.10.1.1. Hücre Kültürü Koşulları

Hazırlanan membranın sert doku ile etkileşecek olan gözenekli yüzeyi fibroblastik yapıdaki MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ile kültüre edilmiştir. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM besi ortamında ve CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiş ve monolayer olarak çoğaltılmışlardır. Membranlara 16. pasajdaki hücreler ekilmiştir.

Hücre kültüründe kitosan (kontrol) (Ch), HA kaplı kitosan membran (HA/Ch), HA kaplı BMP-6 adsorplanmış kitosan membran (HA/BMP-6/Ch) ve HA ve PCL kaplı kitosan membran (HA/Ch/PCL) olmak üzere 4 farklı membran kullanılmıştır. Etilen oksit ile sterilizasyonu gerçekleştirilen membranlar 24 gözlü polistiren hücre kültür kaplarına (TCPS, Orange Scientific, Belçika) yerleştirilmiş ve HA/BMP-6/Ch membranlar dışındaki diğer gruplar 1 gece %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM şartlandırma ortamında bekletilmiştir.

Yüzeyi tamamen kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek amacıyla hücreler FBS içeren α -MEM ortamı ile alınmış ve 5 dk 1,000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra taze besi ortamı ile süspanse edilip homojenize edilen hücreler hemositometre ile sayılmıştır. Hemositometrik sayım sonucu hücre yoğunluğu 2.2×10^6 hücre/mL olarak belirlenmiş ve her bir membrana 36 μ L hücre ekilmiştir. Hücrelerin membran yüzeyine yapışmaları için membranlar 2 saat süresince CO₂ inkübatöründe bekletilmiş ve 2 saat sonrasında %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı eklenmiştir. Kültür, preosteoblast hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını destekleyecek farklılaşma ortamı ile devam ettirilmiştir. Farklılaşma ortamı α -MEM'e FBS ve penisilin-streptomisinin yanısıra 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL L-askorbik asit eklenmesiyle hazırlanmıştır.

Kültür ortamı üç günde bir yarı yarıya taze farklılaşma ortamı ile değiştirilerek hücreler tarafından üretilen büyüme faktörlerinin ortamdaki tamamen uzaklaştırılması engellenmiştir. Membranlara ekilen hücreler 28 günlük kültür süresi boyunca hücre fonksiyonları açısından takip edilmiştir. Tüm işlemler laminar akış kabini içinde (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

3.10.1.2. PrestoBlue Analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin membranlar üzerindeki canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri kültür süresinde farklı zamanlarda yapılan PrestoBlue analizi ile belirlenmiştir. Bunun için kültürün 1., 3., 5., 14., 21. ve 28. günlerinde kültür ortamı başka 24 gözlü kaplara aktarıldıktan sonra her bir göze 50 µL PrestoBlue ve 450 µL farklılaşma ortamı eklenmiştir. Hücreler 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra renk değiştiren ortamdaki 200 µL alınıp 96 gözlülere aktarılmış, optik yoğunluk 600 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropipla okuyucu (Asys UVM 340) ile belirlenmiştir. Membranlar üzerinde kalan PrestoBlue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra membranlar 1 kez steril PBS ile yıkanmış, diğer kaba aktarılmış olan besiy ortamı tekrar membranlar üzerine eklenerek kültüre devam edilmiştir.

3.10.1.3. Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi (SEM)

Kültüre edilen hücrelerin membranlar üzerindeki morfolojilerinin görüntülenmesi amacıyla kültürün 2., 7. ve 14. günlerinde SEM (Carl-Zeiss EVO 506P) analizi yapılmıştır. Örneklerin hazırlanması için membranların üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve membranlar iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 500 µL %2.5'lik (hacim/hacim) glutaraldehit çözeltisi ile +4°C'de 30 dk fikse edilen hücreler tekrar PBS ile yıkanmış ve örnekler analiz yapılmaya kadar PBS içerisinde 4°C'de bekletilmiştir. Analiz yapılacağı zaman membranlar üzerindeki PBS uzaklaştırılmış ve membranlar sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (hacim/hacim) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilmiş sonrasında 5 dk heksametildisilazan (HDMS) içerisinde bekletilen membranlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Analiz öncesi altın-palladyum ile kaplanan örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.10.1.4. Alkalen Fosfat (ALP) Boyama

ALP boyama, membranlar üzerine tutunan hücrelerde ALP enziminin kırmızı renkte boyandığı bir yöntemdir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde besiy ortamı

uzaklaştırıldıktan sonra örnekler PBS ile yıkanmış ve %10'luk soğuk nötral formalin tamponunda (100 mL formalin, 16 g Na₂HPO₄, 4 g NaH₂PO₄.H₂O ve 1L distile su) 15 dk fikse edilmiştir. Tampon uzaklaştırıldıktan sonra örnekler bir kez distile su ile yıkanmış sonrasında 15 dk boyunca distile suda bekletilmiştir. Bu esnada taze substrat hazırlanmış ve filtre (0.45 µm'lik filtre) edilmiştir.

Taze substrat hazırlanırken 0.005 g Naphthol AS MX-PO₄ 200 µL DMF içerisinde çözülmüştür. Tris-HCL (MW=157.6 pH 8.3) 25 mL distile su içerisinde çözülmüştür (0.2M). Hazırlanan çözeltiler karıştırıldıktan sonra 25 mL distile su ilave edilmiş ve hazırlanan karışıma 0.03 g Red Violet LB tuzu eklenmiştir. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra, hazırlanan taze substrat örnekler eklenmiş ve 45 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 4 kez distile su ile yıkanan membranlar 15 dk distile suda bekletilmiştir. Sonrasında örnekler %2.5'luk gümüş nitrat çözeltisinde (2.5 g AgNO₃, 100 mL distile su) 30 dk karanlıkta inkübe edilmiş ve 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Hücreler son olarak 5 dk distile suda bekletilmiş ve 1 kez distile su ile yıkanarak gümüş nitrat tamamen uzaklaştırılmıştır. +4°C'de bekletilen örneklerin optik mikroskop ile görüntüleri alınmıştır.

3.10.1.5. RT-PCR Analizleri

Membranlar üzerinde üreyen ve farklılaşan hücrelerin kollajen I (KOL I), osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN) ve RunX2 ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Rotor Gene 6000, Corbett Life Science, Cambridge, UK) ile belirlenmiştir.

Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde membranlar kültür ortamından alınmış ve steril Ependorf tüplerine (1.5 mL) yerleştirildikten sonra -80°C'de saklanmıştır. RNA izolasyonu gerçekleştirileceği zaman örnekler DNase ve RNase içermeyen mikrotüplere alınarak steril iğne ile parçalanmış ve RNA izolasyonu RNA izolasyon kitindeki (Qiagen®) talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, her bir örneğin üzerine 500 µL Trizol eklenmiş ve örnekler 4°C'de 2 sa bekletilmiştir. Sonrasında örneklerin üzerine 125 µL kloroform eklenmiş, örnekler elde 15-20 kez çalkalanmış ve oda sıcaklığında 3-5 dk inkübe edilmiştir. Örnekler 4°C'de 10 dk 12,000 g'de santrifüjlenmiş ve üstteki sulu RNA fazı RNA-DNA içermeyen yeni Ependorf tüplerine aktarılmıştır. Kloroform basamağı proteinden ve fenolden kaynaklanan kirliliği önlemek amacıyla 2 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sulu RNA fazı kadar %70'lik etanol sulu RNA fazın üstüne eklenmiştir. Etanol çözeltisi

otoklavlanmış ultra saf su ile hazırlanmıştır. Sonrasında sulu RNA fazı RNeasy spin kolonuna aktararak 13,000 rpm'de 15 s santrifüjlenmiş ve alta geçen sıvı atılmıştır. İzolasyon kitinin içinde bulunan RWI tampon çözeltisinden spin kolonuna 700 µL eklenmiş ve 13,000 rpm'de 15 s santrifüjlendikten sonra alta geçen sıvı atılarak spin kolon tekrar kullanılmıştır. Sonrasında RPE tampon çözeltisinden spin kolonuna 500 µL eklenerek yıkama yapıldıktan sonra 13,000 rpm'de 15 s santrifüjlenmiş ve alta geçen sıvı atılarak spin kolon tekrar kullanılmıştır. Spin kolonuna tekrar 500 µL RPE tampon eklenmiş ve 2 dk 13,000 rpm'de santrifüjlendikten sonra spin kolonu altta toplanan tampon çözeltisine değdirilmeden başka bir boş Ependorf tüpüne aktarılmıştır. Spin kolon herhangi bir çözelti eklenmeden boş olarak 13,000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra spin kolonu alınarak toplama tüpü atılmıştır. Son olarak spin kolonu 1.5 mL'lik toplama tüpüne alınmış ve 25 µL RNase içermeyen su eklenerek saflaştırılan RNA 1 dk santrifüjlenmiştir. Spin kolon atılmış, saflaştırılmış RNA suyla birlikte toplama tüpünde elde edilerek konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla nanodrop kullanılmıştır.

RT-PCR analizi, Applied Biosystems Kit cDNA (ABD), SolisBioDyne 5 Hot Firepol® Eva Green® qPCRMix Plus (Estonya) kitleri ile LightCycler® NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 25°C'de 10 dk, 40°C'de 120 dk ve son olarak 85°C'de 5 dk olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Ardından PCR analizi, aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dk, uzatma basamağı 95°C'de 15s, 60°C'de 20s, 72°C'de 20s ve ayrılma basamağı 60°C'de 4s ve 95°C'de 20s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir.

Housekeeping gen olarak β-aktin kullanılmış, β-aktin, RunX2, kollajen I, osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) genlerine ait primer dizileri (Motek, Türkiye) Çizelge 3.2'de verilmiştir. Yapılan analiz sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiş ve tüm veriler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoduna göre hesaplanmıştır [91]. Kitosan membran üzerindeki hücrelerin ilgili gen ekspresyon seviyeleri temel alınarak diğer gruplar bunun katları şeklinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri

β -actin	Forward primer 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3' Reverse primer 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
Kollajen I	Forward primer 5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3' Reverse primer 5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
Osteokalsin	Forward primer 5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG -3' Reverse primer 5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
Osteopontin	Forward primer 5'-CACTTTCCTCAATCGTCCCTAC-3' Reverse primer 5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'
RunX2	Forward primer 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC -3' Reverse primer 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC -3'

3.10.2. MDBK Hücreleri ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışması

3.10.2.1. Hücre Kültür Koşulları

Geliştirilen membranın yumuşak doku ile etkileşecek olan gözeneksiz tarafı epitel yapıdaki MDBK hücreleri ile kültüre edilmiştir. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besi ortamında ve CO₂ inkübatöründe (Heraus Instruments, Almanya) kültüre edilmiş ve monolayer olarak çoğaltılmışlardır. Membranlara 22. pasajdaki hücreler ekilmiştir.

Hücre kültüründe kitosan (kontrol) (Ch), PCL kaplı kitosan membran (Ch/PCL), Mz içeren PCL fiberler ile kaplı kitosan membran (Ch/PCL/Mz), HA ve PCL kaplı kitosan membran (HA/Ch/PCL) olmak üzere 4 farklı membran kullanılmıştır. Etilen oksit ile sterilizasyonu gerçekleştirilen membranlar 24 gözlü polistiren hücre kültür kaplarına (TCPS, Orange Scientific, Belçika) yerleştirilmiş ve membranlar 30 dk %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM şartlandırma ortamında bekletilmiştir.

Yüzeyi tamamen kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek amacıyla hücreler FBS içeren DMEM ortamına alınmış ve 5 dk 1,000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra taze

besi ortamı ile süspansiyon edilip homojenize edilen hücreler hemositometre ile sayılmıştır. Hemositometrik sayım sonucu hücre yoğunluğu 3.24×10^6 hücre/mL olarak belirlenmiş ve her bir membrana 25 µL hücre ekilmiştir. Hücrelerin membran yüzeyine yapışmaları için membranlar 2 saat süresince CO₂ inkübatöründe bekletilmiş ve 2 saat sonrasında %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM ortamı eklenmiştir. Kültür ortamı üç günde bir yarı yarıya taze kültür ortamı ile değiştirilerek hücreler tarafından üretilen büyüme faktörlerinin ortamdan tamamen uzaklaştırılması engellenmiştir. Membranlara ekilen hücreler 12 günlük kültür süresi boyunca hücresel fonksiyonlar açısından takip edilmiştir. Tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

3.10.2.1. PrestoBlue Analizi

MDBK hücrelerinin membranlar üzerindeki canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri kültürün 1., 3., 5., 8. ve 12. günlerinde yapılan PrestoBlue analizi ile belirlenmiştir. Analiz yöntemi Bölüm 3.10.1.2'de açıklanmıştır.

3.10.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi (SEM)

Kültüre edilen hücrelerin membranlar üzerindeki morfolojilerinin görüntülenmesi amacıyla kültürün 8. ve 12. günlerinde SEM (Carl-Zeiss EVO 506P) analizi yapılmıştır. Analiz yöntemi Bölüm 3.10.1.3'de açıklanmıştır.

3.11. İstatistiksel Analiz

Tüm deneysel veriler, üçlü yürütülecek üç benzer deneyin gösterimi olarak \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Çalışma sonuçları Graphpad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

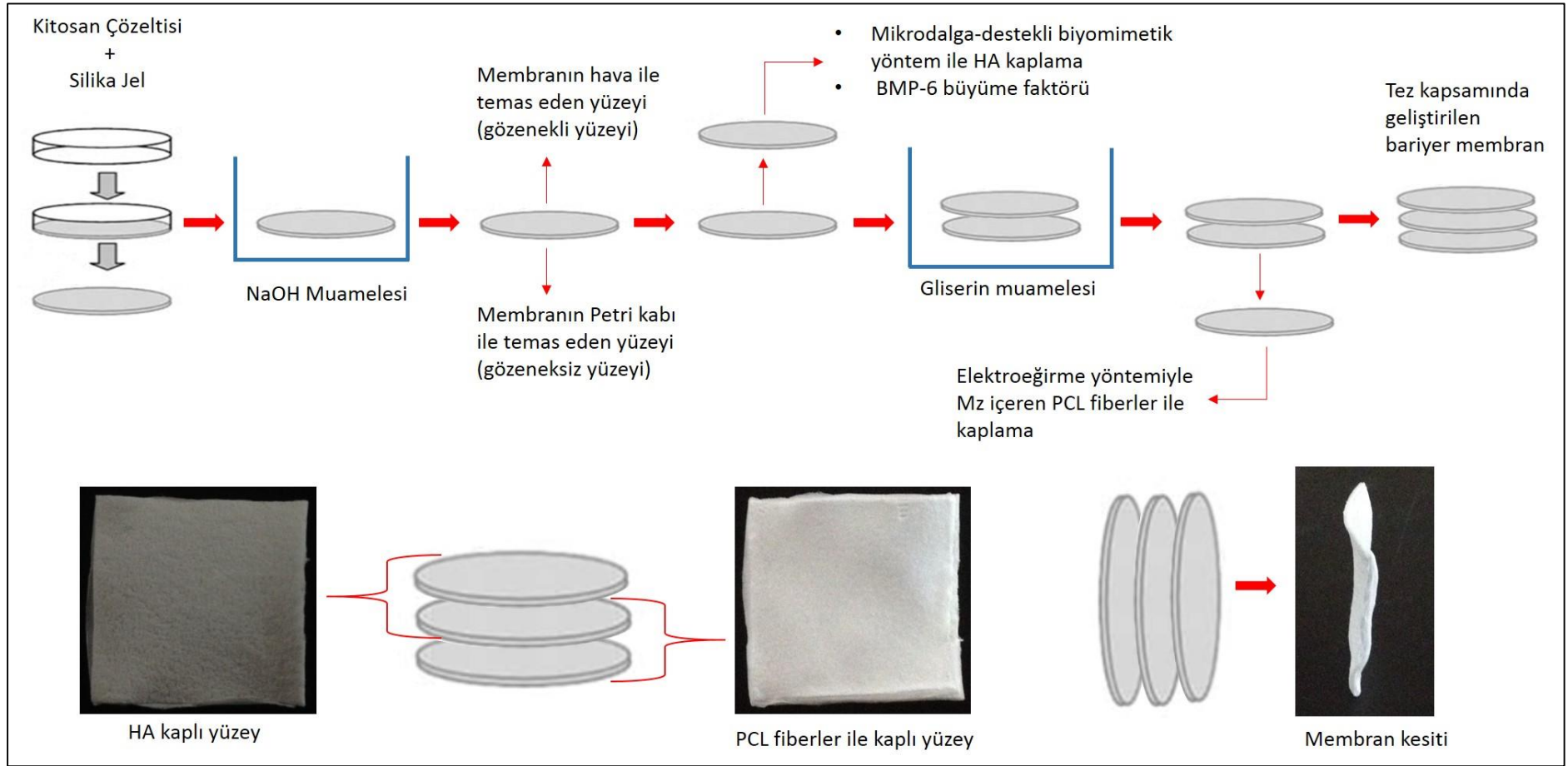
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Sunulan tez çalışmasında kitosan bazlı yeni bir bariyer membran geliştirilmiştir (Şekil 4.1). Bu amaca yönelik olarak öncelikle gözenekli kitosan membranlar üretilmiş, sonrasında kitosan membranın gözenekli yüzeyi mikrodalga-destekli biyomimetik yöntem kullanılarak HA ile kaplanmış ve HA kaplı bu yüzey sonraki aşamada BMP-6 ile zenginleştirilmiştir. Kitosan membranın gözeneksiz yüzeyi elektroçirme yönteminden faydalanarak PCL fiberler ile kaplanmış ve enfeksiyon riskini ortadan kaldırmak amacı ile elektroçirme işlemi sırasında PCL yapısına antibakteriyel ajan olan metronidazol (Mz) ilave edilmiştir. Elde edilen membran çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir. Geliştirilen bariyer membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyeli membranın gözenekli kısmında MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ve gözeneksiz kısmında ise epitel yapıdaki MDBK hücreleri ile yapılan kültür çalışmaları ile belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen tüm sonuçlar bu bölümde tartışılmıştır.

4.1. Kitosan Membran Üretimi

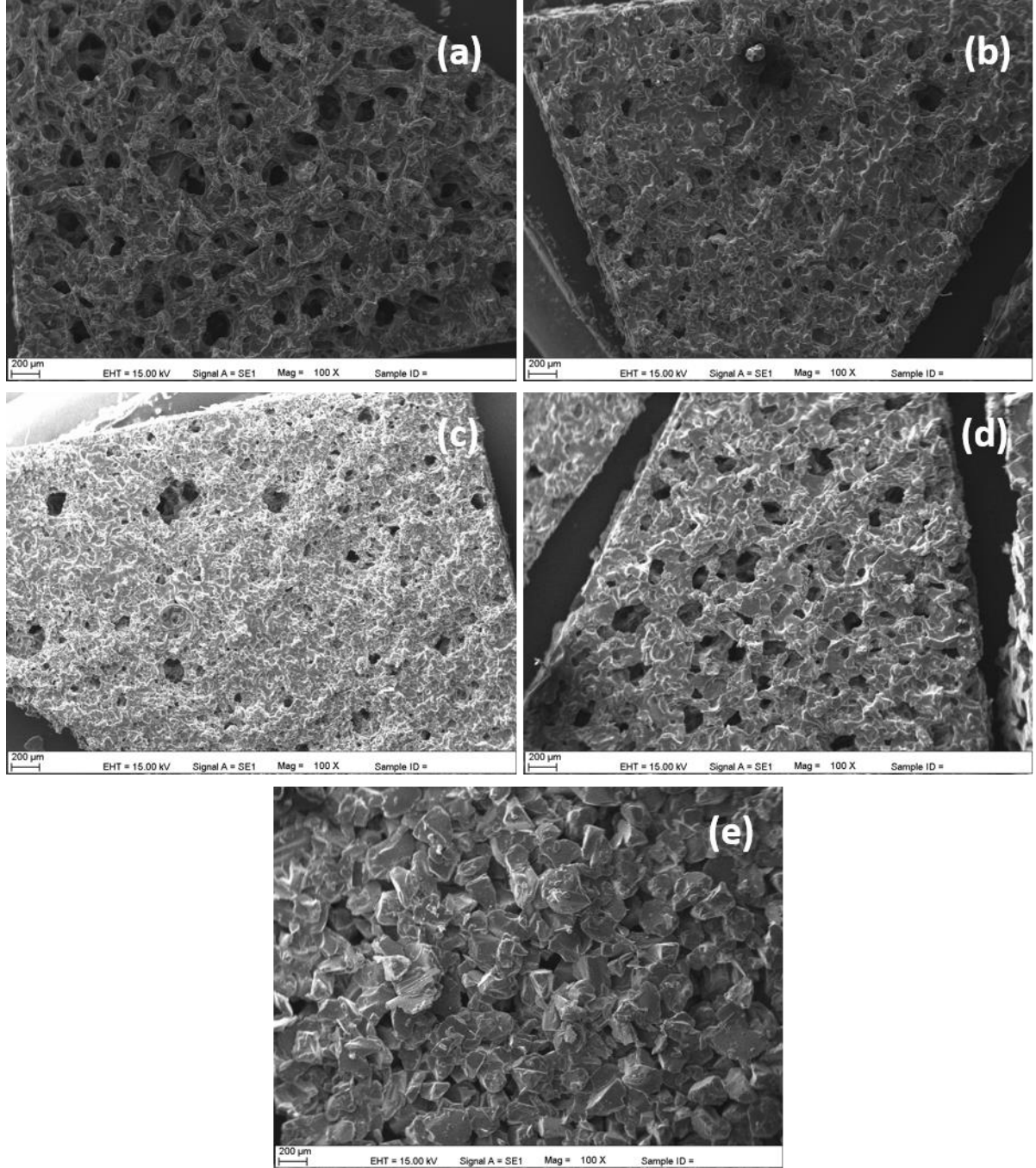
Kitosan, sahip olduğu biyoyoumluluk, biyobozunurluk, toksik olmama ve antibakteriyel özellik taşıma gibi üstün özellikleriyle doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi ve yara örtüsü olarak yaygın bir kullanım potansiyeline sahiptir [146]. Kitosanın sahip olduğu bu üstün özellikler göz önüne alınarak, gerçekleştirilen çalışmada bariyer membranın ana malzemesi olarak kitosandan yararlanılmıştır. Gözenekli kitosan membranlar çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Kitosan suda ve organik çözücülerde çözünmez. Kitosan glikozamin birimlerini çözünebilir $R - NH_3^+$ formuna dönüştüren seyreltik asit çözeltilerinde çözünebilmektedir [147]. Bu amaçla kitosan için iyi bir çözücü olan asetik asitin seyreltik çözeltisi kullanılmıştır.

Gözenek yapıcı ajan olarak 150-250 μm aralığında boy dağılımına sahip silika partikülleri kullanılmıştır. Silika partikülleri çözünürlük açısından kitosan ile zıt özellik göstermektedir. Silika asidik ortamda çözünmezken bazik ortamda çözünmektedir [148]. Bu zıtlıktan yararlanılarak gözenek oluşumu sağlanmıştır. Gözenekli kitosan membran üretiminde öncelikle 4:1 silika/kitosan (ağırlıkça) oranında silika jel kullanılmıştır. Silika partiküllerini yapıdan uzaklaştırmak ve membran stabilizasyonunu sağlamak amacıyla membranlar 2, 6, 12 ve 24 saat süresince 80°C'de NaOH çözeltisi ile muamele edilmiştir. NaOH muamelesi sonrasında membranlar nötr yıkama çözeltisi elde edilene kadar distile su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 4.1. Tez kapsamında geliştirilen bariyer membranın hazırlanma aşamalarının şematik gösterimi

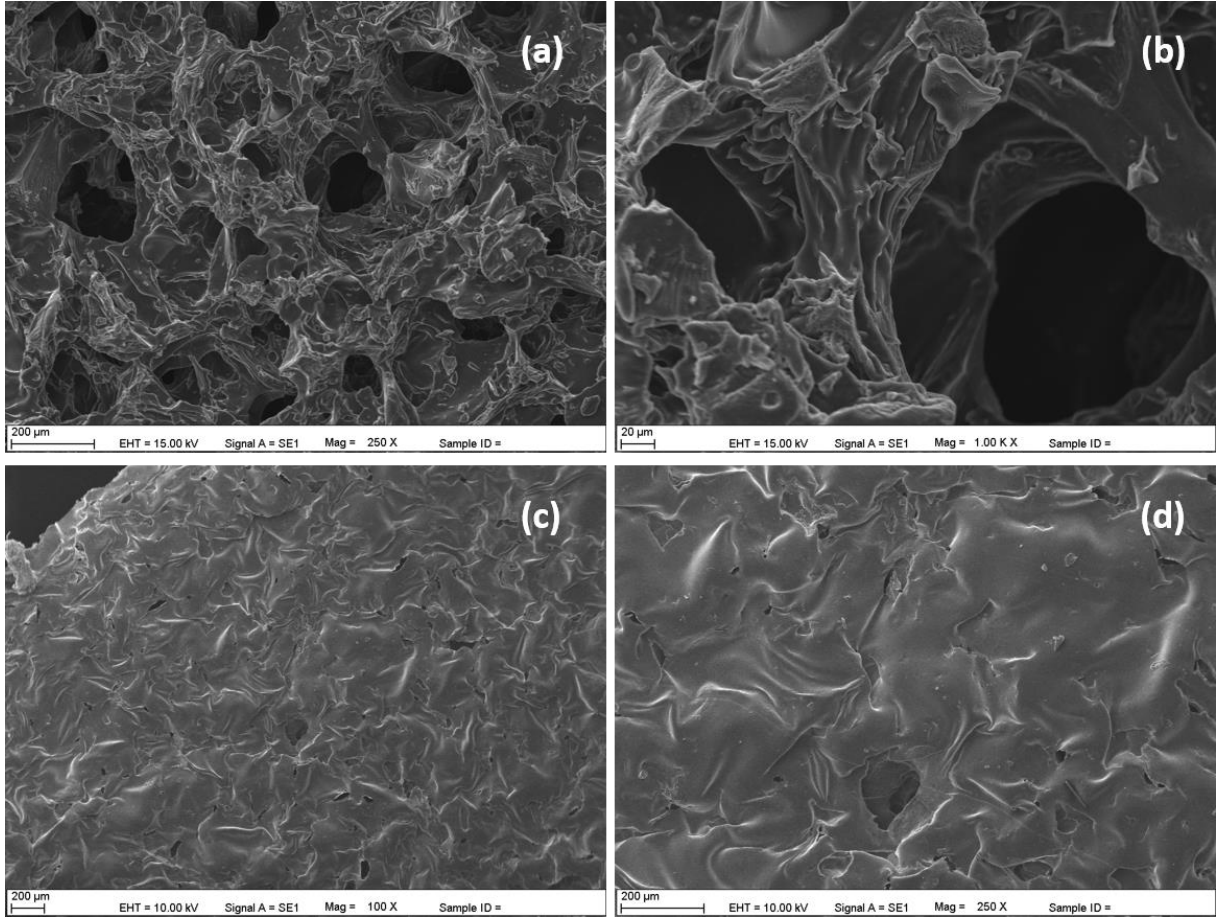
Kuruyan membranlar 30 dk gliserin çözeltisi ile muamele edildikten sonra tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Farklı sürelerde NaOH ile muamele edilen membranlara ait SEM görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı sürelerde NaOH ile muamele edilen gözenekli kitosan membranlara (4:1 silika/kitosan, ağırlıkça) ait yüzey SEM görüntüleri: (a) 2 saat, 100X; (b) 6 saat, 100X; (c) 12 saat, 100X; (d) 24 saat, 100X; (e) NaOH ile muamele edilmeyen kitosan membran

SEM görüntülerinden 2 saat NaOH ile muamelenin silika partiküllerini uzaklaştırmak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Genel bilgiler kısmında da bahsedildiği gibi YDR/YKR yöntemlerinde bariyer membran kullanılmasıdaki amaç epitel hücrelerin hasarlı bölgeye göçünü engellemek ve aynı zamanda hasarlı bölgede osteoblast, sementum ve PDL hücrelerinin üremesi ve rejenerasyonu için gerekli süreyi sağlayarak periodontal rejenerasyonu gerçekleştirmektir. Şekil 4.3’de verilen SEM görüntülerinden membranın hava ile temas eden yüzeyinin gözenekli, Petri kabı ile temas eden yüzeyinin ise gözeneksiz yapıda olduğu açıkça görülmektedir. Membranın gözenekli yüzeyinin hücre yapışmasını ve üremesini desteklemesi amacıyla hasarlı kemik doku ile, gözeneksiz yüzeyinin ise hücre yapışmasını ve üremesini desteklememesi ve epitel hücre göçünü engellemesi amacıyla yumuşak doku ile temas etmesine karar verilmiştir.

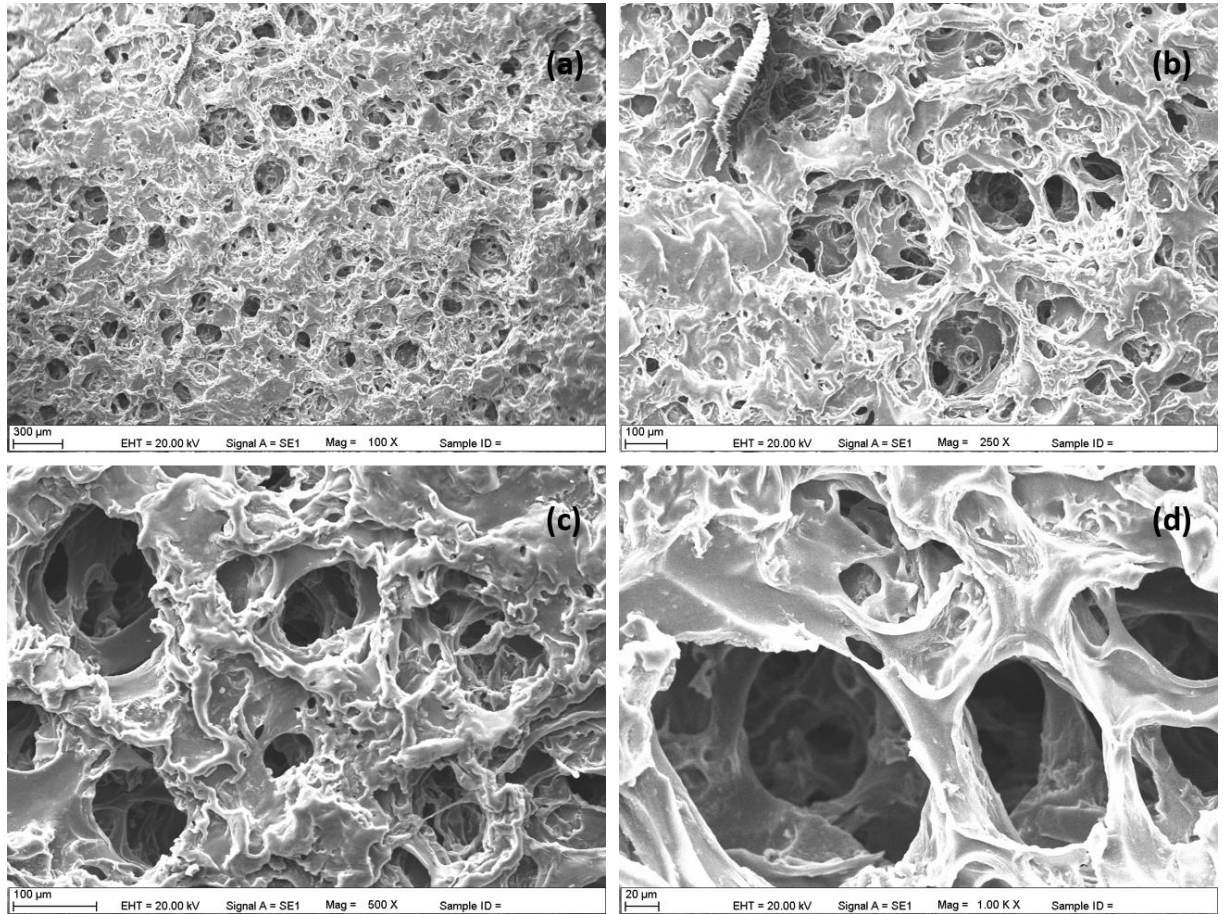


Şekil 4.3. Kitosan membranının (4:1 silika/kitosan, ağırlıkça) hava ile temas eden yüzeyi (gözenekli yüzey) ve Petri kabı ile temas eden yüzeyi’ne (gözeneksiz yüzey) ait SEM görüntüleri: (a) gözenekli yüzey, 250X; (b) gözenekli yüzey, 1,000X; (c) gözeneksiz yüzey, 100X; (d) gözeneksiz yüzey, 250X

Doku iskelelerinde gözeneklilik ve gözeneklerin iskele boyunca birbirleri ile bağlantılı olmaları besin maddelerinin ve gazların difüzyonu ve aynı zamanda hücrelerin aktiviteleri

sonucunda açığa çıkan metabolik atıkların uzaklaştırılması açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle doku iskeleleri oldukça gözenekli bir yapıya ve aynı zamanda birbirleriyle bağlantılı açık gözeneklere sahip olmalıdır [51]. Kitosan miktarının 4 katı kadar silika jel eklenmesiyle birbirleri ile bağlantılı açık gözenekler elde edilmiştir. Şekil 4.2 a ve Şekil 4.3 a'dan da görüldüğü gibi gözenekler membran yüzeyi boyunca homojen bir biçimde dağılmıştır. Ancak SEM görüntülerinden de anlaşıldığı gibi elde edilen membranda gözeneklilik yeterli değildir. Bu nedenle, gözenekliliği arttırmak amacıyla silika jel miktarının artırılmasına karar verilmiştir.

Membran gözenekliliğini arttırmak amacıyla 8:1 silika/kitosan (ağırlıkça) oranında silika jel kullanılmıştır. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'den de görüldüğü gibi, aynı şekilde sert doku ile temas edecek olan kısmı gözenekli, yumuşak doku ile temas edecek olan yüzeyi ise gözeneksiz yapıda olan bir membran elde edilmiştir.



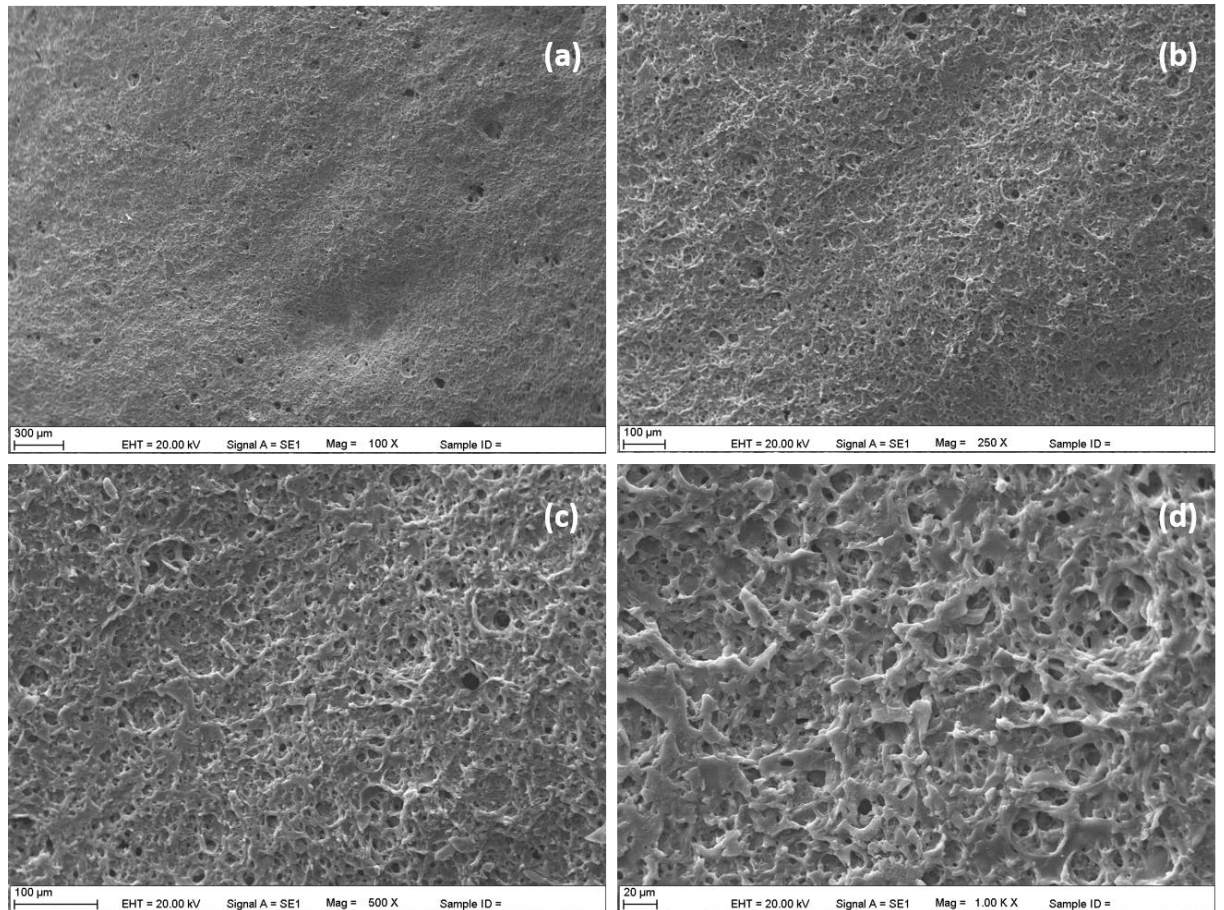
Şekil 4.4. Kitosan membranının (8:1 silika/kitosan, ağırlıkça) gözenekli yüzeyine ait SEM görüntüleri: (a) 100X; (b) 250X; (c) 500X; (d) 1,000X

Membrana eklenen silika partikül oranınının 4:1'den 8:1'e yükseltilmesiyle gözeneklilik belirgin bir biçimde artmıştır. Yüzey boyunca homojen bir gözenek dağılımı ve aynı

zamanda birbirleriyle bağlantılı açık gözenekler elde edilmiştir. Üretilen kitosan membranda gözeneklerin membran kesiti boyunca da homojen olarak dağıldığı ve birbirleri ile bağlantılı olduğu SEM görüntüleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 4.6 a ve b).

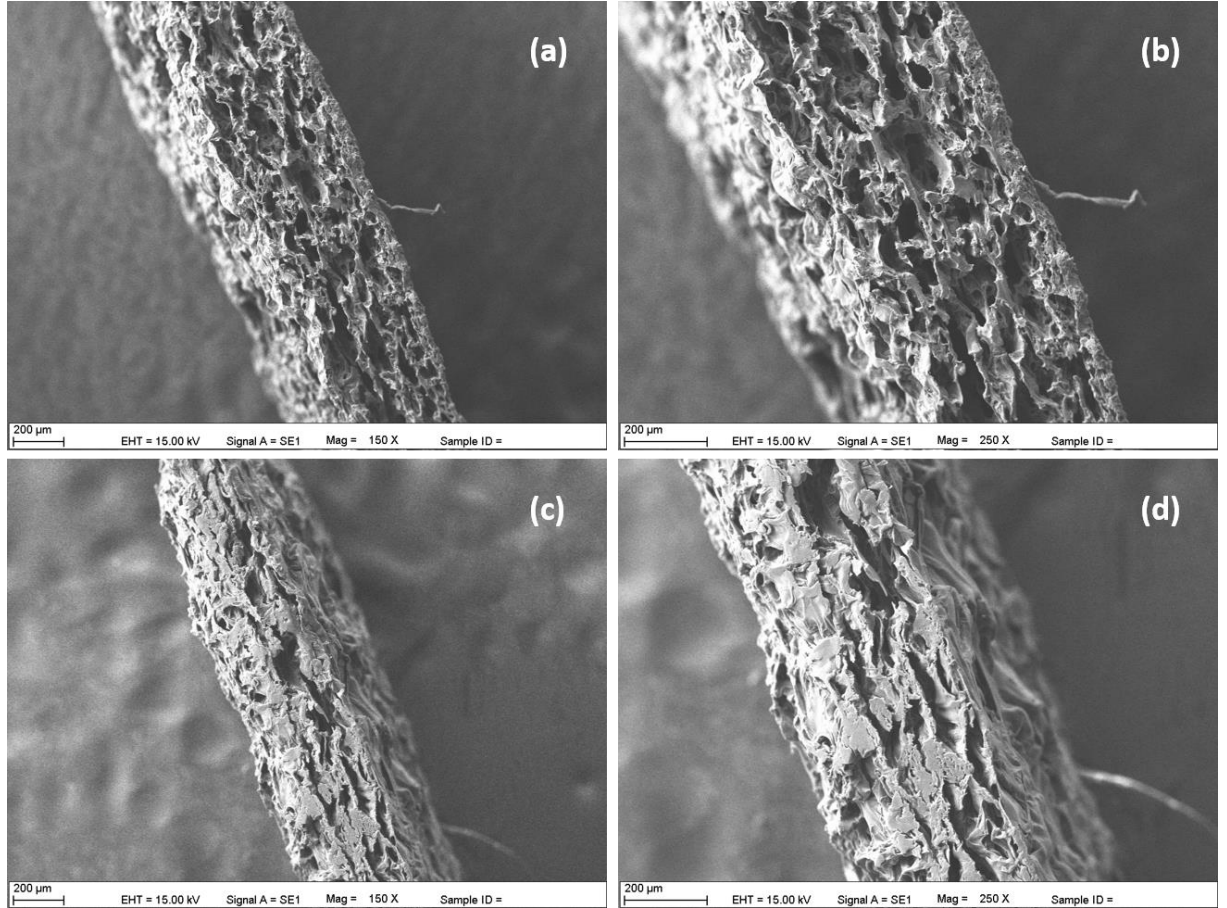
Gözenek boyutu doku iskelelerinde dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli noktadır. Gözenek boyutu çok küçük olursa gözenekler hücreler tarafından tıkanır ve buna bağlı olarak doku iskelesi boyunca hücrelerin penetrasyonu ve ECM üretimi engellenir [51]. Hücrelerin doku iskelesi boyunca penetre olabilmeleri için gözenek boyutu yeterli derecede büyük olmalıdır [149]. Porojen olarak 150-250 µm boyut aralığında silika partiküllerinin kullanılmasıyla oldukça büyük gözenekler elde edilmiştir. Ortalama gözenek boyutu 169.7 ± 78.7 µm olarak belirlenmiştir.

Membrana eklenen silika partikül oranının 4:1'den 8:1'e yükseltilmesiyle membranın gözeneksiz kısmında yüzey pürüzlülüğü artmıştır.



Şekil 4.5. Kitosan membranının (8:1 silika/kitosan, ağırlıkça) gözeneksiz yüzeyine ait SEM görüntüleri: (a) 100X; (b) 250X; (c) 500X; (d) 1,000X

Geliştirilen kitosan membran YDR/YKR yöntemlerinde kullanılacağından, membranın kolay bir şekilde manipüle edilebilmesi gerekmektedir. Üretilen kitosan membran son derece kırılğan ve serttir. Kitosanın kırılğan doğası, gliserin muamelesi ile giderilmiş ve böylelikle kolay bir şekilde manipüle edilebilen oldukça esnek bir membran elde edilmiştir. Gliserin ile muamele edilen ve edilmeyen kitosan membranlara ait SEM görüntüleri Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. Kitosan membrana (8:1 silika/kitosan, ağırlıkça) ait kesit SEM görüntüleri: (a) gliserin ile muamele edilmiş, 150X; (b) gliserin ile muamele edilmiş, 250X; (c) gliserin ile muamele edilmemiş, 150X; (d) gliserin ile muamele edilmemiş, 250X

Gliserin ile muamele edilen membranlarda gözenekler kesit boyunca daha net bir şekilde belli olmaktadır. Ayrıca gliserin muamelesi sonucunda membran kalınlığında yaklaşık 100 μm kadar (Çizelge 4.1) bir artış gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kitosan membrana ait fiziksel özellikler

Silika jel (ağırlıkça)	Ortalama gözenek çapı (μm)	Ortalama membran kalınlığı ^a (μm)	Ortalama membran kalınlığı ^b (μm)
8	169.7 \pm 78.7	408.6 \pm 42.2	519.3 \pm 23.4

^a Gliserin ile muamele öncesi, ^b gliserin ile muamele sonrası

Çalışma kapsamında aynı bileşimde olup, farklı zamanlarda hazırlanmış membranlarla yürütülen SEM incelemeleri, hazırlama yönteminin membran özellikleri açısından tekrarlanabilir sonuçlara götürdüğünü belirtmiştir.

4.2. Kitosan Membran Yüzeyinin HA ile Kaplanması

Kitosan hücre yapışmasını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyen hidrofilik bir yüzeye sahiptir. Ancak kitosan biyoaktif özelliğe sahip değildir. Kitosanın biyoaktivitesi yapısına katılan kalsiyum fosfat seramikleri ile artırılabilir [150].

Xianmiao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada periodontal rejenerasyonda kullanılmak amacıyla çözücü döküm yöntemiyle kitosan membran üretilmiş ve membranın biyoaktivitesini arttırmak amacıyla membran üretimi sırasında yapıya HA partikülleri katılmıştır [89].

HA partikülleri yapıya katılmak yerine plazma spreyleme, iyon püskürtme, sol-jel birikimi gibi yöntemlerle kitosan matrislerin yüzeyine kaplanabilir. Ancak bu yöntemler bir takım dezavantajlara sahiptirler. Bunlar arasında oldukça yüksek proses sıcaklıkları ve oldukça yüksek/düşük pH'a ihtiyaç duyulması yer almaktadır. Yüksek sıcaklık ve pH bu yöntemlerde polimerik malzemelerin kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca bu yöntemler ile elde edilen apatitler yüksek kristalin özellik göstermekte ve kemik yapısında bulunan apatitlerden farklı kristal yapı sergilemektedirler. Bu yöntemlerde yaşanan bir diğer problem de malzeme yüzeyinde homojen ve ince bir kaplamanın elde edilmesindeki zorluklardır [151].

Bahsedilen yöntemlere alternatif olarak Kokubo ve ark. tarafından biyomimetik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem ile düşük kristaliniteye sahip nano boyutlarda, kemik benzeri apatit elde edilebilmektedir. Ayrıca ılımlı proses koşullarına sahip olduğu için polimerik olan ve olmayan pek çok yüzey bu yöntem ile HA ile kaplanabilir [151].

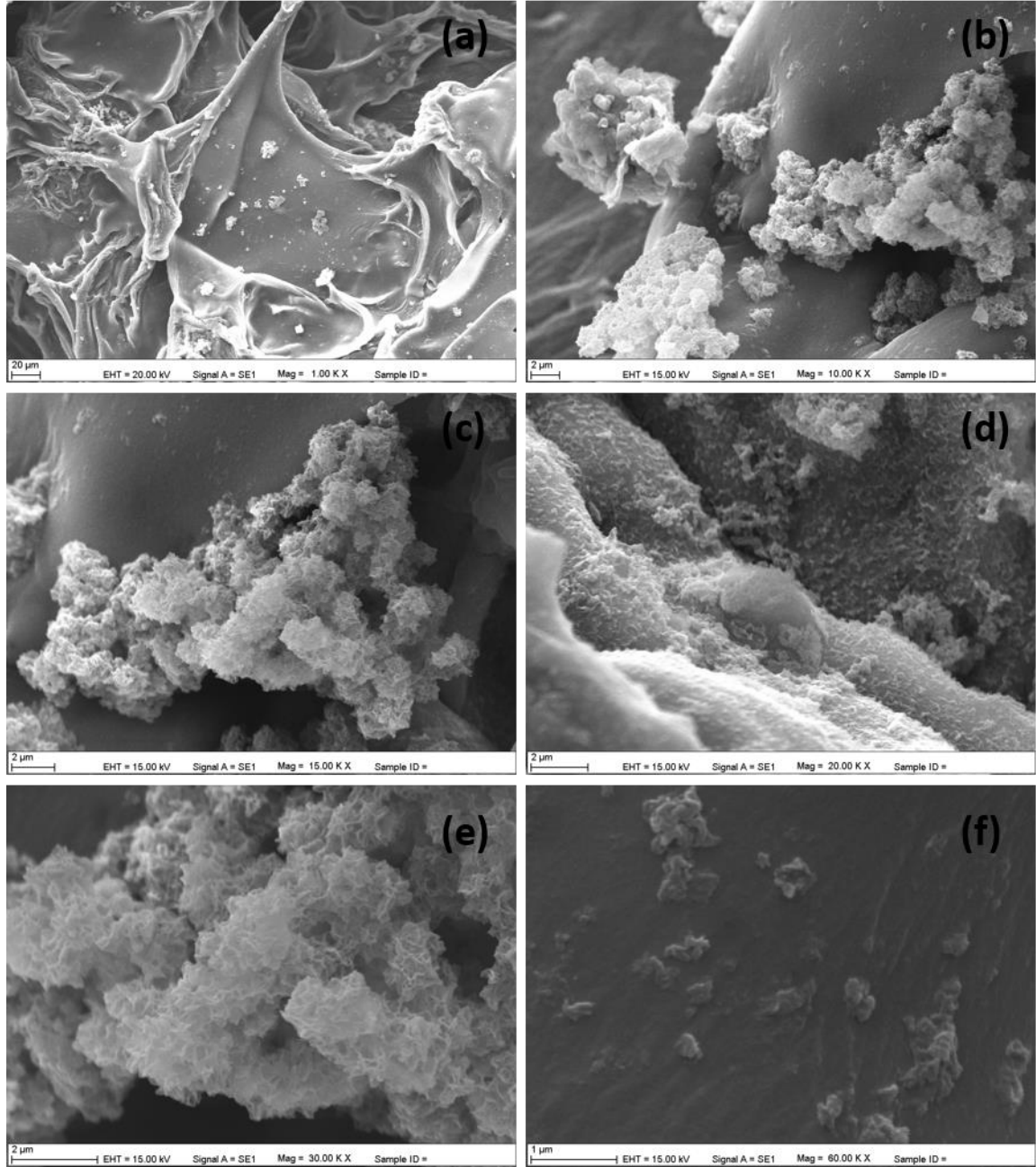
Kitosanın yapısında amin ve hidroksil grupları bulunmaktadır [152]. Kitosan SBF içerisine daldırıldığında kitosan yüzeyinde bu gruplar üzerinden apatit oluşumu gözlemlenmektedir. Kitosanın yapısında bulunan azot atomu bağlanmamış iki elektronundan dolayı pozitif merkezler için çekirdeklenme noktasıdır. Azot atomu üzerinden mineral birikimi çekirdeklenme mekanizması ile gerçekleşmektedir. Kitosanın yapısında bulunan katyonik amin grubu fosfat iyonunun adsorbsiyonunu uyarır ve böylelikle mineralizasyonu tetikler. Hidroksil grubu ise kalsiyumu bağlayarak mineralizasyon için çekirdeklenmeyi başlatmaktadır. Tüm bunlara ek olarak kitosanın hidrofilik yapısı da apatit oluşumunu

desteklemektedir. Kitosanın *in vitro* biyomineralizasyonunu arttırmak amacıyla çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Bu yöntemler arasında gluteraldehit ile çapraz bağlama, fosforilasyon, kalsiyum hidroksit, kalsiyum klorür ve kalsiyum silikat muamelesi yer almaktadır. Bu muameleler ile kitosan yüzeyinde kalsiyum ve fosfatın bağlanabileceği çekirdeklenme noktaları oluşturulmaktadır [153]. Bahsedilen muamelelere ek olarak, SBF içerisine batırılan kitosan yüzeyinde apatitik çekirdeklenmeyi arttırmak amacıyla yüzeyi silinol (Si-OH) grubu (tetraetil orto-silikat, TEOS ile muamele ederek) ile işlevselleştirmek de sıklıkla kullanılmaktadır [154].

Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada (Kaynak G., 2012) kitosan süpergözenekli hidrojel doku iskelesi eş zamanlı mikrodalga ışıma ile çapraz bağlama/gaz köpükleştirme yöntemi ile üretilmiş ve üretilen iskeleler SBF içerisine daldırılarak HA ile kaplanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmanın literatürden farkı SBF ile kaplamanın mikrodalga ile desteklenmesidir. Mikrodalga enerjisi kitosan yapısında bulunan OH^- ve NH_2^+ gibi fonksiyonel grupları uyararak bu gruplar üzerinden kalsiyum ve fosfat iyonlarının bağlanmasını sağlamaktadır. Böylelikle kitosanın fonksiyonelleştirilmesine ya da herhangi bir kimyasal işlem uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Kitosan mikrodalgaya maruz kaldığında kitosanın yapısında bulunan OH^- ve NH_2^+ gibi fonksiyonel gruplar mikrodalga enerjisini fazlasıyla absorblayarak dielektrik ısınmaya neden olurlar. Bu yüksek enerji OH^- ve NH_2^+ bağlarının kırılmasına böylelikle radikal uçların oluşmasına neden olur. Ayrıca kitosan bu yüksek enerjiyi belirli bir bölgede depolayamayacağından, enerji hızla SBF içerisindeki su ve iyonlara aktarılmakta ve bu enerji aktarımı da çekirdeklenmeyi uyarmaktadır. Mikrodalga enerjisinin sağladığı bir diğer avantaj da mikrodalğanın HA'ın çökmesi için gerekli Gibbs serbest enerjisini düşürmesi ve böylelikle kitosanın aktive olmuş bölgelerinde çekirdeklenmeyi arttırarak kaplama süresini kısaltmaktır. Sonuç olarak mikrodalga enerjisi ile kısa sürede daha etkin bir kaplama elde etmek mümkündür [92].

Grubumuz tarafından yapılan çalışmada (Kaynak G., 2012) 40-50 nm uzunluğunda %1.61 (w/w) Ca/P oranında ve %9.22 (w/w) karbonat içeriğine sahip iğne benzeri morfolojide ve kemik benzeri amorf yapıda hidroksiapatit üretilmiştir. Sonraki aşamada ise kitosan süpergözenekli hidrojel doku iskelelerinin yüzeyi HA ile kaplanmış ve nano küre morfolojisinde HA elde edilmiştir. HA kaplamaya ait Ca/P oranı EDX analizi ile 1.62 ± 0.93 olarak bulunmuş ve kaplamadaki hidroksiapatitlerin de kemik benzeri kimyasal yapıya sahip olduğu sonucuna varılmıştır [92].

Bu çalışmada aynı yaklaşım kitosan membran için uygulanmış ve optimize edilen koşullarda kitosan membranın gözenekli yüzeyi HA ile kaplanmıştır.



Şekil 4.7. Mikrodalga yardımı ile 10xSBF çözeltisinde 4 kez kaplama yapılmış kitosan/HA membranlara ait SEM görüntüleri: (a) 1,000X, (b) 10,000X, (c) 15,000X, (d) 20,000X, (e) 30,000X, (f) 60,000X

Kaplama yapılmadan önce membran SBF içerisine daldırılmış ve vakum altında gözeneklerdeki hava uzaklaştırılarak tüm gözeneklerin SBF ile temas etmesi sağlanmıştır. Kaplama öncesinde bu işlemin gerçekleştirilmesindeki amaç membranın sadece yüzeyinin değil aynı zamanda gözeneklerinin de HA ile kaplanmasını sağlamaktır.

Membran yüzeyinde etkin bir kaplamanın gerçekleşmesi için, membran her seferinde taze SBF kullanarak 4 kez HA ile kaplanmıştır. Her kaplamadan sonra çekirdeklenme bölgeleri oluşmuş ve bu çekirdeklenme bölgelerine kalsiyum ve fosfat iyonlarının yığılmasıyla HA yapının büyümesi sağlanmıştır. Şekil 4.7’de verilen 4 kez kaplama ile elde edilen kitosan/HA’ye ait SEM görüntülerinden membran yüzeyinin etkin bir şekilde HA ile kaplandığı görülmektedir.

SBF ile yapılan kaplamalarda genellikle karnabahar benzeri morfolojiye sahip apatit oluşumu gözlenmektedir [91]. Kitosan membran üzerindeki kaplamada da karnabahar benzeri morfolojiye sahip olan apatit yapılar görülmektedir.

SEM-EDX analizi ile membran yüzeyindeki HA kaplamaya ait Ca ve P oranları bulunmuş ve ortalama Ca/P oranı 2.54 ± 0.59 olarak hesaplanmıştır. Bu farklılığın SEM-EDX analizinin, örneğin sadece belirli bölgelerinden yapılabilmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneğin tamamından yapıldığı için, endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analizi ile daha güvenilir bir sonuç elde edileceği düşünülmektedir.

Grubumuz tarafından yapılan çalışmada (Tunçay Ö., 2013) mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit üretilmiş ve yapılan EDX analizi sonucunda Ca/P oranları sırasıyla 2.11 ± 0.21 ve 2.13 ± 0.74 olarak bulunmuştur. ICP-OES sonuçlarına göre yapılan hesaplarda ise bu değerler sırasıyla 1.61 ve 1.40 olarak bulunmuştur [91].

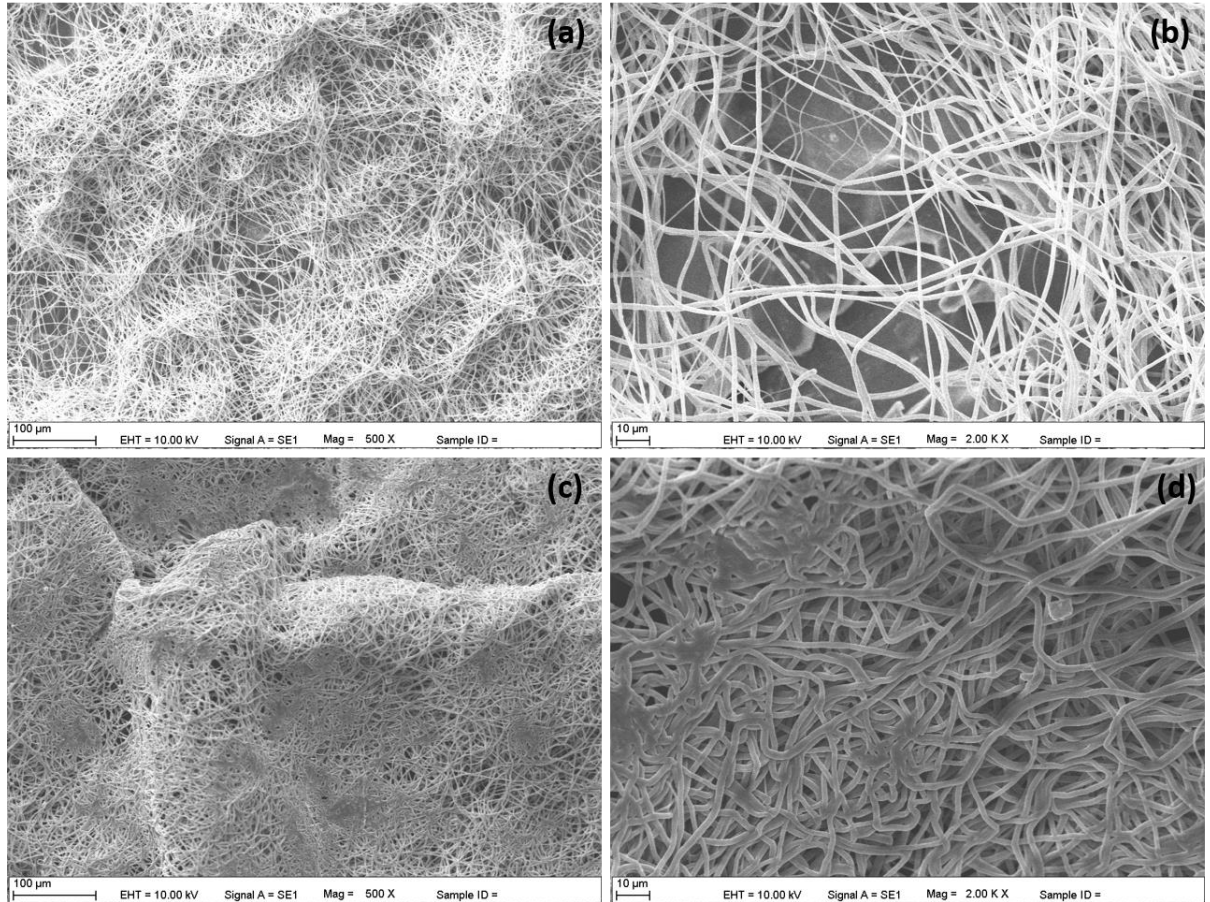
4.3. Kitosan Membranın PCL Fiberler ile Kaplanması

Periodontal rejenerasyonu engelleyen temel etken epitel hücrelerin hasarlı bölgeye göçüdür. Geliştirilen membranın yumuşak doku ile temas edecek olan yüzeyi epitel hücre göçünü engellemek amacıyla elektroğirme yöntemi kullanılarak PCL fiberler ile kaplanmıştır. PCL’in tercih edilmesindeki neden, PCL’in hidrofobik özelliği nedeniyle hücre yapışmasını ve çoğalmasını düşük oranda desteklemesi, ayrıca yüksek mekanik dayanımı ve ucuz olmasıdır.

Elektroğirme işlemi optimize edilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Şırınga ucu ile toplayıcı arasına 27.5 kV’luk bir voltaj (Gamma High-Voltage Research, FL, USA) uygulanmış, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 35 cm ve PCL çözeltisinin sisteme besleme hızı saatte 2 mL olarak ayarlanmıştır. Membranın gözeneksiz yüzeyi 3 ve 7 dk boyunca PCL

fiberler ile kaplanmıştır. Optimize edilen koşullarda boncuk içermeyen fiber yapılar elde edilmiştir. SEM görüntülerinden (Şekil 4.8 a,b) membran yüzeyini 3 dk boyunca PCL fiberler ile kaplamanın yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır. Sonraki aşamada membran yüzeyi 7 dk boyunca PCL fiberler ile kaplanmış ve SEM görüntülerinden (Şekil 4.8 c,d) membran yüzeyinin tamamen PCL fiberler ile kaplandığı sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, sonraki aşamalarda membran yüzeyinin 7 dk boyunca PCL fiberler ile kaplanmasına karar verilmiştir.

Yang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PCL 2,2,2-trifloroetanol içerisinde çözülerek PCL çözeltisi hazırlanmış ve elde edilen çözeltiliye H_3PO_4 ve $Ca(OH)_2$ arasındaki çökme reaksiyonu ile elde edilen nano-HA partikülleri eklenmiştir. Elde edilen çözeltiliden; çözeltinin sisteme besleme hızı 2 mL/h, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 12 cm ve sisteme uygulanan voltaj 18-22 kV olacak şekilde elektroğirme yöntemi ile YDR/YKR uygulamalarında kullanmak üzere bariyer membran üretilmiştir [80].



Şekil 4.8. PCL fiber kaplı membran yüzeylerine ait SEM görüntüleri: (a) 3 dk, 500X; (b) 3dk, 2,000X; (c) 7 dk, 500X; (d) 7 dk, 2,000X

Bottino ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada periodontal rejenerasyonda kullanılmak üzere elektroğirme yöntemiyle birden fazla tabakadan oluşan bariyer membran üretilmiştir. Üretilen membran kemik ve epitel doku ile temas edecek fonksiyonel yüzeylerden ve ara tabakalardan oluşmaktadır. Ara tabakalar sırasıyla PLCL poli(DL-laktid-ko-e-kaprolakton):PLA:GEL(jelatin), PLCL, PLCL:PLA:GEL'den oluşmaktadır. Membranın kemik doku ile temas edecek olan kısmı PLA:GEL + nano-HA'den ve epitel hücreler ile temas edecek olan kısmı da PLA:GEL + metronidazol benzoattan oluşmaktadır [57].

Literatürde elektroğirme yöntemi ile bariyer membranların üretildiği çalışmalara bir sonraki bölümde de örnekler verilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde; bariyer membranlar doğrudan elektroğirme yöntemi ile üretilmiştir. Ancak bu çalışmada kitosan membran çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile üretildikten sonra membranın gözeneksiz yüzeyi elektroğirme yöntemi ile PCL fiberler ile kaplanmıştır. Bu yaklaşım geliştirilen membranı mevcut membranlardan farklı kılmaktadır. PCL fiberlerin kitosan membran yüzeyine çözücü etkileşimleri ile kuvvetle tutunduğu düşünülmektedir. Ayrıca PCL fiberler fizyolojik ortam koşullarında yüzeyden kalkmamaktadır. Sonuç olarak PCL fiberler etkin bir şekilde membran yüzeyine yapışmaktadır.

PCL pek çok ilaca karşı gösterdiği yüksek geçirgenlikten dolayı kontrollü ilaç salımı için oldukça uygundur. Ayrıca yavaş bozunma hızından dolayı uzun dönemli salımlar için yaygın olarak tercih edilmektedir [155].

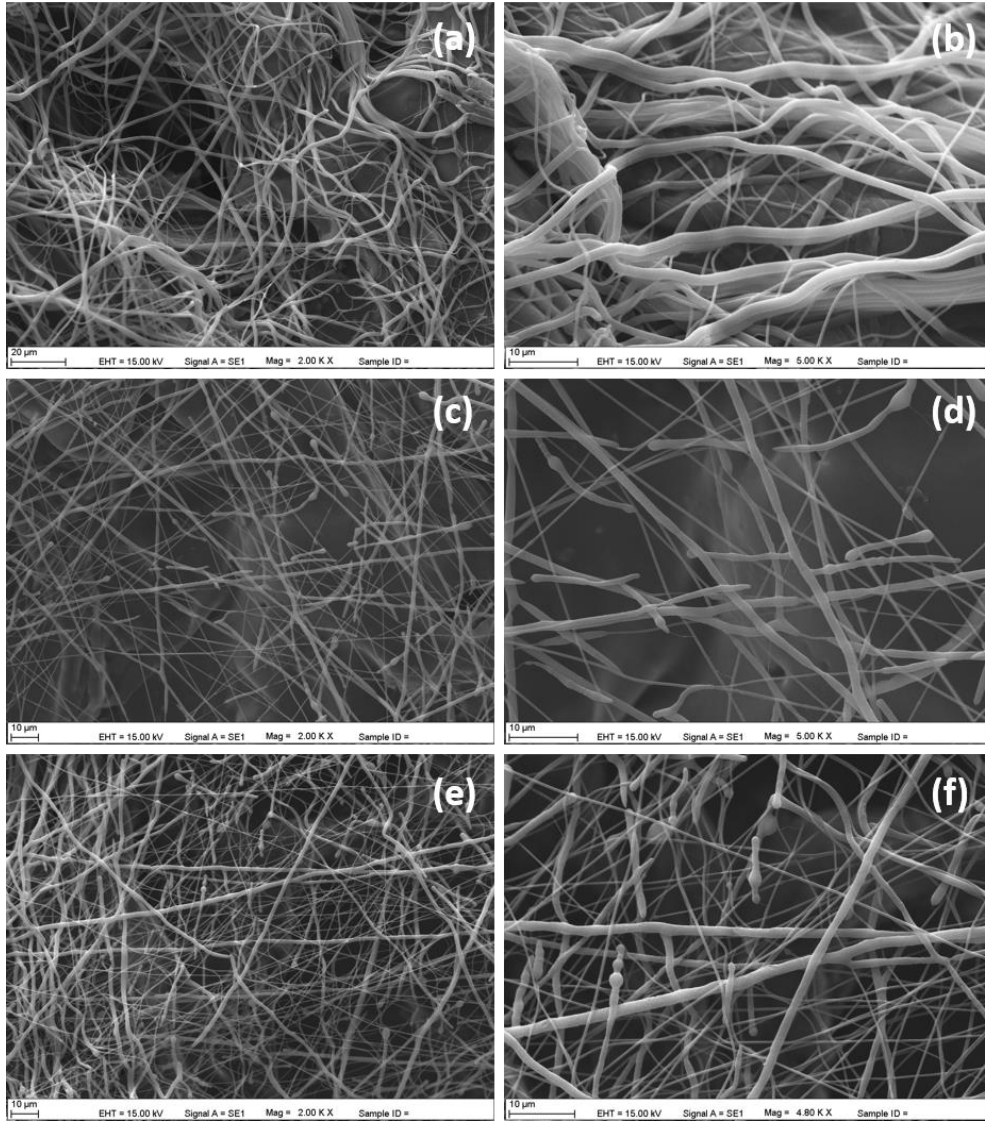
Gerçekleştirilen çalışmada yumuşak dokudaki inflamasyonu elimine etmek amacıyla membran yüzeyi elektroğirme yöntemi kullanılarak ağırlıkça % 5, 10 ve 15 metronidazol içeren PCL fiberler ile kaplanmış ve *in vitro* koşullarda salım çalışmaları yapılmıştır. Özellikle PCL yapısına ağırlıkça % 10 ve % 15 Mz eklendiğinde (Şekil 4.9 c,d,e,f) fiberlerin morfolojilerinde farklılıklar gözlenmiştir. Fiberlerin morfolojilerinde gözlenen bu farklılıklar Mz'ün PCL yapısına katıldığını kanıtlamaktadır. PCL yapısına ağırlıkça % 5 Mz eklendiğinde (Şekil 4.9 a,b) fiberlerin morfolojilerinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Metronidazol içeren ve içermeyen PCL fiber çapları SEM görüntülerinden Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. PCL fiber çapları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. PCL fiber çapları

Fiberler	Ortalama fiber çapı (μm)
PCL	1.271 ± 0.350
PCL (%5 Mz)	1.262 ± 0.416
PCL (%10 Mz)	0.928 ± 0.297
PCL (%15 Mz)	0.916 ± 0.350

Çizelge 4.2’de verilen değerler incelendiğinde; PCL yapısına eklenen metronidazol miktarının fiber çaplarına etki ettiği sonucuna varılmıştır. PCL yapısına eklenen metronidazol miktarı arttıkça fiber çapı azalmaktadır.



Şekil 4.9. Mz içeren PCL fiberler ile kaplı membran yüzeyi: (a) % 5 Mz içeren PCL fiberler, 2,000X; (b) % 5 Mz içeren PCL fiberler, 5,000X; (c) % 10 Mz içeren PCL fiberler, 2,000X; (d) %10 Mz içeren fiberler, 5,000X; (e) % 15 Mz içeren PCL fiberler, 2,000X; (f) % 15 Mz içeren PCL fiberler, 4,800X

Shi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada elektroğirme yöntemi ile PCL, PCL/metronidazol, PCL/jelatin/metronidazol ve PCL/jelatin/metronidazol/asetik asitten oluşan nanofiber membranlar üretilmiş ve üretilen membranların YDR/YKR amaçlı kullanım potansiyelleri incelenmiştir. Shi ve ark. PCL çözeltisinin iletkenliğini 6.43 ± 1.32 $\mu\text{s}/\text{cm}$, PCL/Mz çözeltisinin iletkenliğini ise 7.41 ± 1.48 $\mu\text{s}/\text{cm}$ olarak bulmuşlar ve PCL çözeltisine metronidazol eklenmesiyle çözeltinin iletkenliğinin arttığını buna bağlı olarak fiber çapının azaldığını belirtmişlerdir. PCL organik çözücülerde çözündüğünde iyonlarına ayrılmaz. Metronidazolün eklenmesiyle PCL çözeltisinin viskozitesi ve yüzey gerilimi azalmakta diğer taraftan da iletkenliği artmaktadır. Genel olarak, çözeltinin iletkenliği arttığında jet tarafından daha fazla miktarda elektriksel yük taşınır. Böylece elektriksel alan altında jet üzerindeki yüksek uzama kuvvetleri uyarılır. Bunun sonucunda jetin aldığı yol uzar ve çözeltinin daha fazla gerilmesi sağlanır. Sonuç olarak fiber çapında azalma gözlenir [67].

Zamani ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PCL farklı oranlarda (90:10, 80:20 ve 70:30; v/v) diklorometan/dimetilformamid içeren çözücülerde çözülerek elektroğirme yöntemi ile PCL fiberler üretilmiş ve sonraki aşamalar için 80:20 (v/v) diklorometan/dimetilformamid oranı optimum değer olarak seçilmiştir. Çözelti içerisine %5, 10 ve 15 (ağırlıkça) metronidazol benzoat eklenmiş ve çözeltiye eklenen metronidazol benzoat miktarı arttıkça fiber çaplarının azaldığı gösterilmiştir. Fiber çaplarındaki azalmanın metronidazol benzoat eklenmesiyle çözeltinin viskozitesindeki azalmaya ve çözeltinin iletkenliğindeki artmaya bağlı olduğu belirtilmiştir [156].

Bu bilgiler ışığında, sunulan çalışmada literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, PCL yapısına metronidazol eklenmesiyle elde edilen fiber çaplarında azalma gözlemlenmiştir.

4.3.1. *In Vitro* Metronidazol Salımı

Elektroğirme yöntemi nano ile birkaç mikron boyut aralığında polimerik fiberler üretilmesine olanak tanıyan ucuz bir yöntemdir. Kontrollü salım uygulamalarında elektroğirme yöntemi enkapsülasyon gibi diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Elektroğirme yönteminde ilaç yükleme verimi diğer yöntemlere göre daha yüksektir. Ayrıca ilaç salım profili nanofiberlerin bileşimi, gözenekliliği ve morfolojileri değiştirilerek istenen biçimde ayarlanabilir. İlaç ve polimeri içeren çözeltinin spinlenmesi ile ilaç doğrudan fiberlere yüklenir [156].

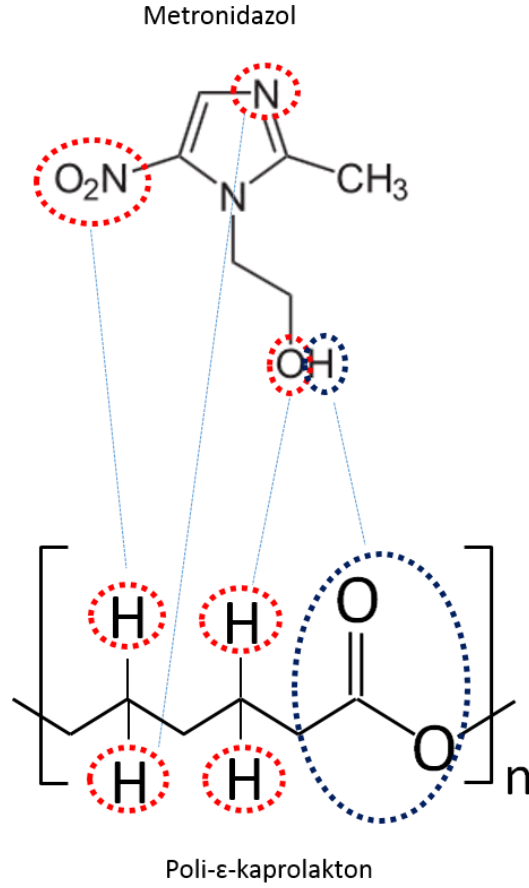
Elektroegirme yöntemi ile üretilen fiberlere hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikteki ilaçlar yüklenebilmektedir. Ancak ilacın ilaç-polimer-çözücü sistemindeki çözünürlüğü ve uyumu ilacın salım kinetiğine etki etmektedir [157].Yapılan çalışmalar; ilacın kısa sürede salınmasının ve başlangıçta ani bir salım yapmasının ilaç-polimer-çözücü sistemindeki uyumsuzluktan kaynaklandığını belirtmektedir [158-162].

Zamani ve ark. tarafından yapılan çalışmada PCL fiberlerin yapısına yüklenen metronidazol benzoatın düşük bir ani salımla 19 gün boyunca kontrollü olarak salındığı belirtilmiştir. Metronidazol benzoat ve PCL hidrofobik özellik göstermektedir. İlaç ile polimer arasındaki uyumluluk ve çekimin ilacın nanofiberlere yüklenmesinde önem taşıdığı belirtilmiş ve yapılan çalışmada; ilacın uzun süre salınması, ilacın nanofiberlere başarılı bir şekilde yüklenmesine bağlanmıştır [156].

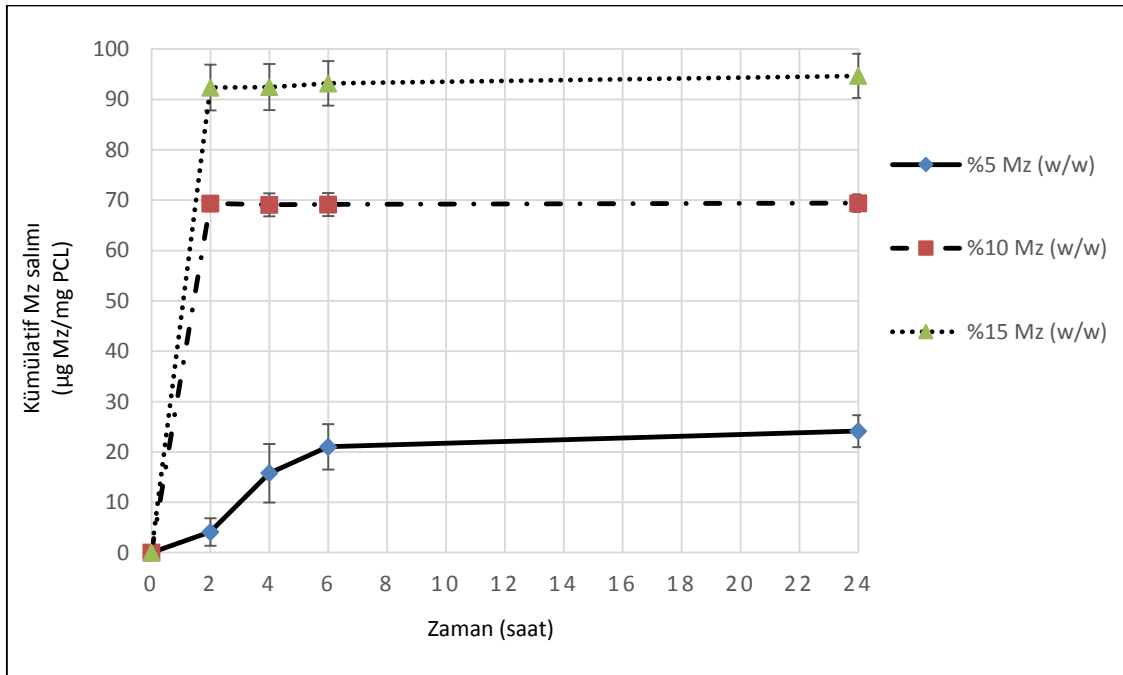
Shi ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada hidrobik bir polimer olan PCL yapısına hidrofilik bir ilaç olan metronidazol yüklenmiştir. Aynı miktarda metronidazol içeren farklı nanofiber membranlar 1 hafta içerisinde yapılarındaki metronidazolün %90'ından fazlasını salmışlar ve yüksek bir ani salım sergilemişlerdir. 7-14. günler arasında salım profili lineerdir ve 14. günde tüm membranlar için kümülatif salım %97'den fazlasına ulaşmıştır [67].

PCL nonpolar, metronidazol ise polar olmasına rağmen bu maddeler aralarında kurdukları hidrojen bağlarından dolayı iyi bir uyumluluk göstermektedirler. Shi ve ark. metronidazol yapısında bulunan -OH, C=N ve -NO₂ gruplarındaki oksijen ve azot atomlarının PCL'in yapısında bulunan -CH grubundaki hidrojen atomu ile hidrojen bağı oluşturabileceğini ayrıca metronidazol yapısındaki -NO₂ ve -OH gruplarındaki hidrojen atomunun PCL'in ester gruplarıyla hidrojen bağı oluşturabileceğini belirtmişlerdir [67]. Metronidazol ile PCL arasında oluşan bu hidrojen bağlarının şematik gösterimi Şekil 4.10'da verilmiştir.

Metronidazol salımı 37°C'de sodyum azid içeren PBS ortamında gerçekleştirilmiş ve salım kinetiği nanodrop ile 319 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Ağırlıkça % 5, 10 ve 15 metronidazol içeren PCL fiberler ile kaplı kitosan membranlara ait salım grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Mz ile PCL arasında oluşan hidrojen bağlarının şematik gösterimi



Şekil 4.11. Farklı miktarlarda Mz içeren PCL fiberler ile kaplı kitosan membranlardan kümülatif Mz salım grafiği

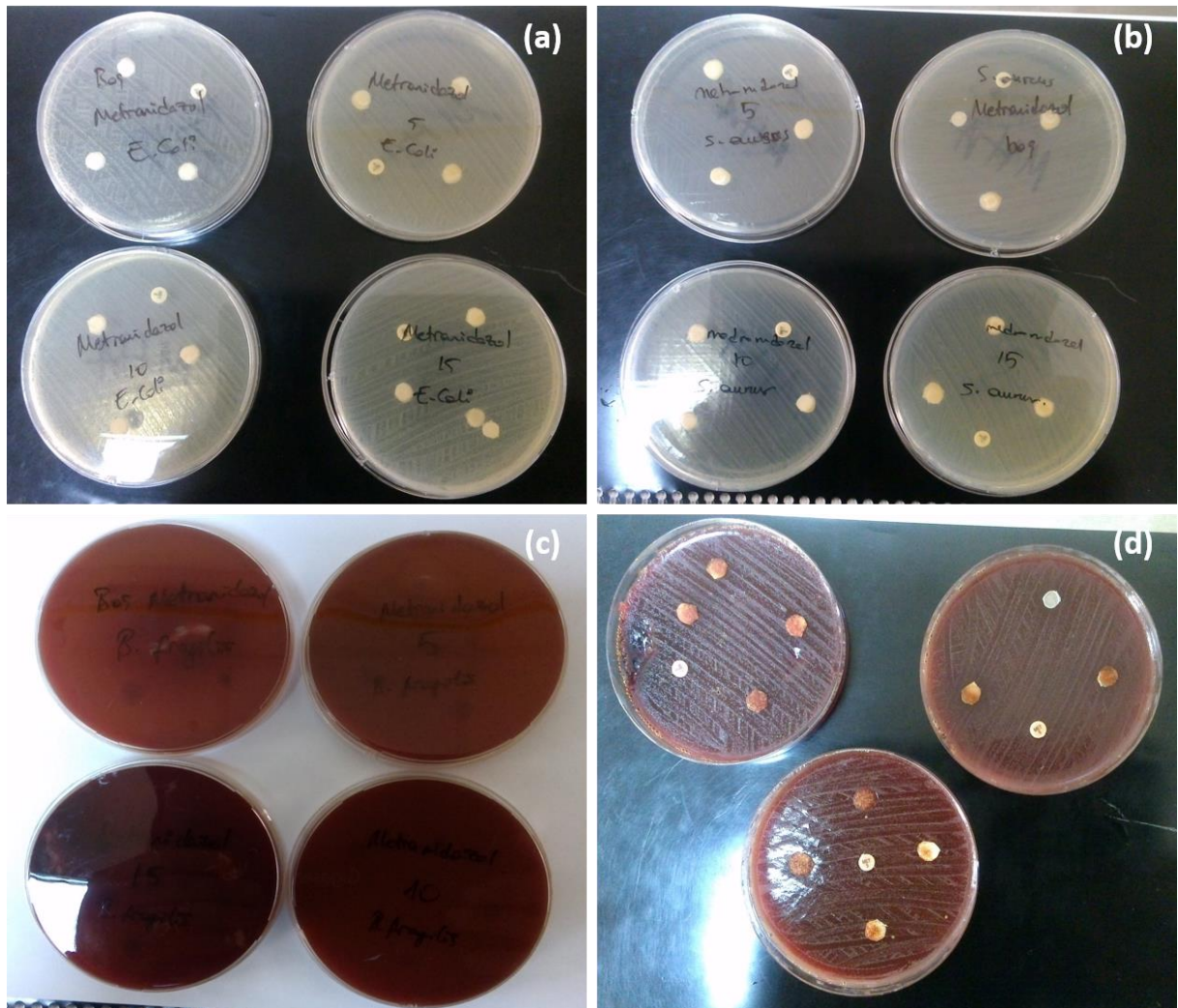
Kümülatif metronidazol salımı, mg PCL başına salınan μg Mz olarak verilmiştir. Salım profiline göre, PCL yapısına eklenen Mz miktarı arttıkça salınan Mz miktarı da artmaktadır. %10 Mz içeren membran yüksek bir ani salımla 2. saatte mg PCL başına 69.34 μg Mz salmıştır. 2-24. saatler arasında salım grafiği lineerdir ve 24. saatte mg PCL başına 69.40 μg Mz salınmıştır. %15 Mz içeren membran da yüksek bir ani salım göstererek 2. saatte mg PCL başına 92.35 μg Mz salmıştır. Benzer şekilde 2-24. saatler arasında salım grafiği lineerdir. 24. saatte mg PCL başına 94.66 μg Mz salınmıştır. Sonuç olarak her iki membran da içerdiği ilaç miktarının büyük bir miktarını 2 saat içerisinde salmıştır. %5 Mz içeren membran diğer membranlara göre daha yavaş bir ani salım göstermiştir. 6. saatte mg PCL başına 21.00 μg Mz salınmıştır. 6-24. saatler arasında salım grafiği lineerdir ve 24. saatte 24.12 μg Mz salınmıştır. Sonuç olarak %5 Mz yüklü membran 6 saat içerisinde içerdiği ilaç miktarının büyük bir miktarını salmıştır.

Reise ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada elektroğirme yöntemiyle ağırlıkça %1, 5, 10, 20, 30 ve 40 metronidazol içeren poli(l-laktid-ko-d/l-laktid) fiberler üretilmiş ve fiberlerden Mz salım kinetiği incelenmiştir. Tüm fiberler ilk 48 saat içerisinde yapılarındaki metronidazolün yaklaşık olarak %20'sini salmıştır. %10 ve 20 (w/w) metronidazol içeren fiberler en düşük fiber çaplarına sahiptirler ve bu fiberlerden başlangıçta hızlı bir salım gerçekleşmiştir. %20 Mz içeren fiberler PBS ortamına konulur konulmaz içeriğindeki ilacın %21'ini, 48 saat içerisinde de %43'ünü salmıştır. Ancak daha yüksek çaplı fiberler PBS ortamına daldırıldığında yapılarındaki ilacın çok az bir miktarını salmıştır. Tüm fiberler ilk iki gün hızlı bir salım profili sergiledikten sonra ilerleyen günlerde salım grafiği daha lineer bir hal almıştır [163].

Literatürde gerçekleştirilen salım çalışmalarında, metronidazol salımı fiberlerin bileşimine, türüne ve morfolojilerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sonuç olarak tez kapsamında geliştirilen membrandan metronidazol salımı gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Antibakteriyel Etkinlik

Metronidazol salımının antibakteriyel etkinliği, *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*, ATCC 25285, gram negatif, zorunlu anaerob), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*, ATCC 29667, gram pozitif, mikroaerofil), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923, gram pozitif, fakültatif anaerob) ve *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922, gram negatif, fakültatif anaerob) standart bakteri suşları ile belirlenmiştir. Bunun için PCL fiberler ile kaplı membran ve %5, 10 ve 15 (ağırlıkça) metronidazol içeren PCL fiberler ile kaplı membranlar (6 mm) olmak üzere 4 grup kullanılmıştır. Ayrıca karşılaştırma yapmak amacıyla standart metronidazol (5 µg/ 6 mm disk) diski de kullanılmıştır. Elde edilen görüntüler (Şekil 4.12) incelendiğinde standart metronidazol diski de dahil olmak üzere örneklerin hiçbirinde inhibisyon zon çapı gözlenmemiştir.



Şekil 4.12. Membranlardan salınan metronidazol'un antibakteriyel etkinliği: (a) *E. coli*, (b) *S. aureus*, (c,d) *B. fragilis*

Chen ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı oranlarda etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) içeren polimetakrilik asit (PMAA) nano jeller üretilmiş ve nano jellere daldırma yöntemiyle metronidazol yüklenmiştir. Nano jeller içeriğindeki EGDMA miktarına bağlı olarak farklı miktarlarda metronidazol ile yüklenmiş ve nano jelden salınan metronidazol'un antibakteriyel etkinliği *B. fragilis* suşu ile belirlenmiştir. Mz/PMAA-1 (23.2 µg Mz/mg), Mz/PMAA-2 (69.1 µg Mz/mg), Mz/PMAA-3 (47.7 µg Mz/mg) nano jellere ait inhibisyon zon çapları sırasıyla 12.7 mm, 10.8 mm ve 8.9 mm olarak bulunmuştur [164]. El-Newehy ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada da elektroöğirme yöntemi ile polivinil alkol (PVA)/polietilen oksit (PEO)/metronidazol içeren nano fiberler üretilmiş ve fiberlerden salınan metronidazolün antibakteriyel etkinliği *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* ve *Aspergillus flavus* suşları ile belirlenmiştir. Geliştirilen sistemin *E. coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapı 540. dk da 3.5 mm olarak ölçülmüştür [165]. Ferreira ve ark tarafından yapılan çalışmada propolis ve metronidazol içeren mikropartiküller üretilmiş ve üretilen mikropartiküllerin antibakteriyel etkinliği *S. aureus* ve *E. coli*'yi de içeren pek çok suş ile belirlenmiştir. Metronidazol'un *S. aureus* ve *E. coli* üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) sırasıyla; 37.50 ve 75.00 mg/mL olarak belirlenmiştir [166]. Frauenhoffer ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada metronidazol, amoksisilin ve metronidazol/amoksisilin kombinasyonun *S. sanguinis*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Porphyromonas gingivalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliği incelenmiş ve metronidazol'un *S. sanguinis* üzerindeki MIC değeri >128 (µg/mL) olarak belirlenmiştir [167].

Literatürde gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde metronidazol'un *B. fragilis*, *E. coli*, *S. aureus*, ve *S. sanguinis* bakteri suşları üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada metronidazol'un antibakteriyel etkinliğinin gözlenememesinin nedeninin membranlardan salınan metronidazol miktarının MIC değerinin altında olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Standart metronidazol diskinde (5 µg/ 6 mm disk) de antibakteriyel etkinliğin gözlenememesi bu durumu desteklemektedir. Membran yüzeyindeki PCL fiber kalınlığı arttırılarak membranlardan salınan metronidazol'un antibakteriyel etkinliği gözlenebilir. Antibakteriyel etkinliğin belirlenmesinde 6 mm çapa sahip membranlar kullanılmıştır, ancak tez kapsamında geliştirilen bariyer membranın boyutları 2x2 cm² olup cerrahi müdahale sırasında, antibakteriyel etkinliğin belirlenmesinde kullanılan membran boyutundan daha büyük boyuttaki membran kullanılacaktır.

Böylelikle, geliştirilen membranın yumuşak dokudaki iltihap etkisini ortadan kaldırabileceği düşünülmektedir.

Pozitif kontrol oluşturmak amacıyla penisilin, ampisilin, eritromisin, moksifloksasin, doksisisiklin, klindamisin, amoksisilin klavulanik asit ve gentamisin standart antibiyotiklerinin bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkinliği incelenmiş ve elde edilen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Standart antibiyotiklerin antibakteriyel etkinlikleri

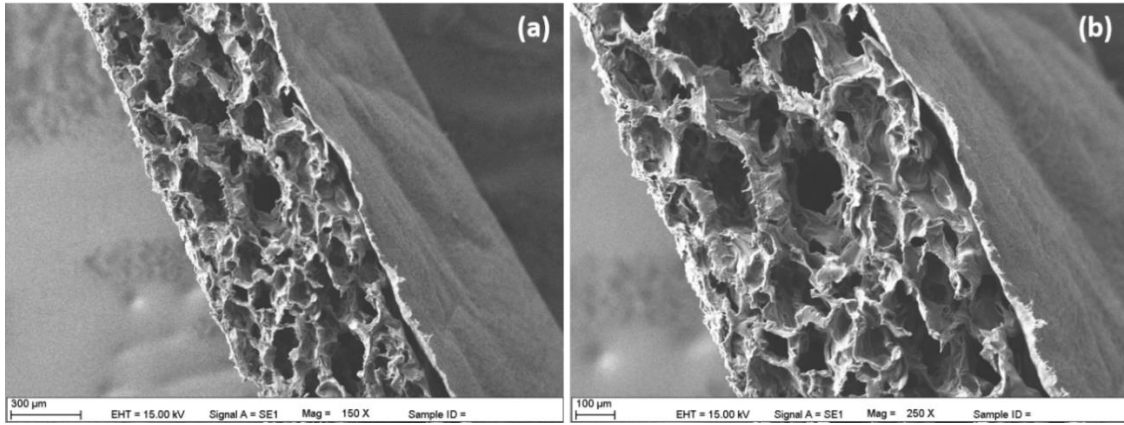
Suşlar	İnhibisyon zon çapları (mm)								
	Standart antibiyotikler ^a								
	P	AM	E	MXF	D	CC	AMC	GN	MET
	10	10	15	5	30	2	30	10	5
<i>S. aureus</i> ATCC25923	33	28	27	27	28	26	30	24	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	NT	19	NT	34	24	NT	24	26	-
<i>S. sanguinis</i> ATCC29667	35	33	25	27	25	30	35	24	-
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	NT	25	NT	35	28	35	40	20	-

P: penisilin, AM: ampisilin, E: eritromisin, MXF: moksifloksasin, D: doksisisiklin, CC: klindamisin, AMC: amoksisilin klavulanik asit, GN: gentamisin, MET: metronidazol, NT: test edilmedi, (-) etki gözlenmedi^a µg/6 mm disk

4.4. Geliştirilen Bariyer Membranın Karakterizasyonu

4.4.1. SEM Analizi

Tez kapsamında üretilen membranların yüzey ve kesit morfolojileri alınan SEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Membran üretiminin her aşaması için elde edilen SEM görüntüleri yukarıdaki bölümlerde verilmiştir. Bu bölümde geliştirilen membrana ait kesit SEM görüntülerine yer verilmiştir. Kitosan membranın gözenekli yüzeyi HA ve gözeneksiz yüzeyi PCL fiberler ile kaplandıktan sonra membran kalınlığı SEM görüntülerinden (Şekil 4.13) Image J programı kullanılarak 750.1 ± 21.9 µm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Tez kapsamında geliştirilen bariyer membrana ait kesit SEM görüntüleri: (a) 150X, (b) 250X

4.4.2. Şişme Çalışmaları

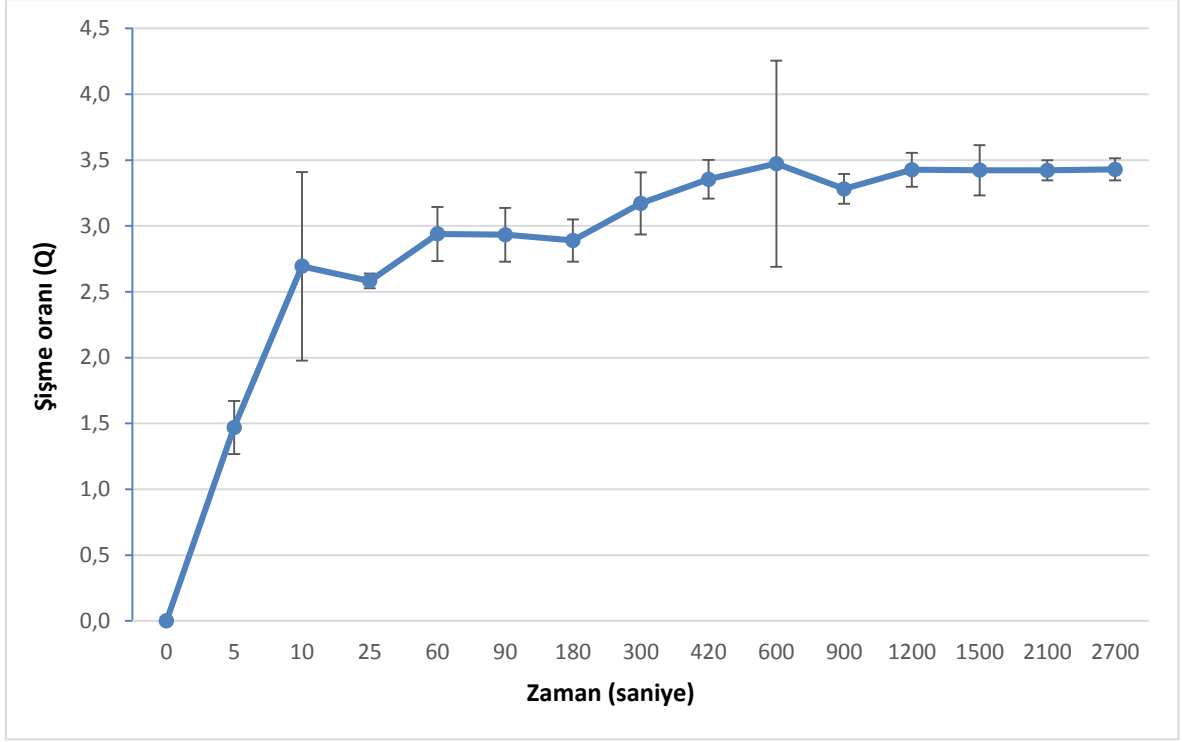
HA/Ch/PCL membranın 37°C’de PBS içerisinde (pH=7.4) 3 paralel örnek ile gerçekleştirilen şişme testlerinin sonucunda elde edilen denge şişme oranı Çizelge 4.4’de verilmiştir. Şişme testinde 9 mm boyutundaki membran kullanılmış ve örneklerin şişme oranları (Q) Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler zamana karşı grafiğe geçirilerek membrana ait şişme eğrisi (Şekil 4.14) elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Tez kapsamında geliştirilen bariyer membrana ait şişme karakteristiği

Membran	Dengeye ulaşma süresi (s)	Denge şişme oranı
HA/Ch/PCL	1200	3.43±0.13

Membranların kuru ve şişme sonrası görüntüleri incelendiğinde, şişme sonrasında membranların hacminde artış gözlemlenmekte ve şişmeye bağlı olarak yapı bütünlüğünde herhangi bir bozulma olmadan membranlar şekillerini korumaya devam etmektedir.

Şişme eğrisi incelendiğinde membranın ilk 10 saniyede hızlı bir şekilde şiştiği görülmektedir. Membran 20. dakikadan itibaren denge şişmesine ulaşmıştır.



Şekil 4.14. HA/Ch/PCL membrana ait zamana karşı şişme oranları (Şişme ortamı: PBS, pH:7.4, 37°C)

Gözeneklerin birbirleri ile olan bağlantıları HA'in sağladığı mekanik dayanım ile korunmakta ve gözeneklerin çökmesi engellenmektedir. İlgili literatürde de belirtildiği gibi birbiri ile bağlantılı gözenekler kapiler kuvvetlerle suyun hızlı bir şekilde absorblanmasına olanak tanır [168].

Kaynak G. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada HA toz/kitosan hidrojel (HA partikülleri hidrojel üretimi sırasında yapıya katılmıştır) HA kaplama/kitosan hidrojele (hidrojel mikrodalga destekli biyomimetik yöntem ile HA ile kaplanmıştır) göre daha yüksek şişme oranına sahip olduğu, ayrıca her iki hidrojel de boş kitosan hidrojele göre daha yüksek şişme oranına sahip olduğu belirtilmiştir [92]. Xianmiao ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise en yüksek şişme değerine boş kitosan membranda ulaşıldığı ve kitosan membran yapısına eklenen HA miktarının artmasıyla şişme oranının azaldığı sonucuna varılmıştır [89]. Mota ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada çözücü döküm yöntemi ile kitosan/biyoaktif cam nano partikül kompozit membranlar üretilmiştir. Üretilen membranın PBS/lizozim ortamında 5 dk içerisinde denge şişmesine ulaştığı belirtilmiştir. Hem kitosan hem de kitosan/biyoaktif cam nano partikül membran %130 oranında şişme değeri göstermişlerdir [2].

Sonuç olarak geliştirilen bariyer membran sahip olduğu gözeneklerin yarattığı kapiler kuvvetlerle suyu absorblayarak 20 dk da şişme dengesine ulaşmıştır.

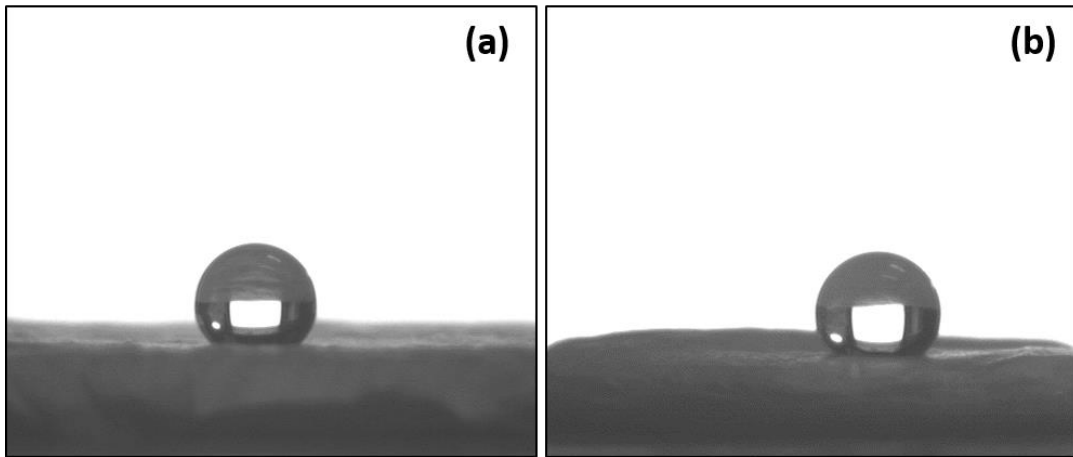
4.4.3. Temas Açısı Ölçümü

Membran yüzeylerinin hidrofilisitesi oda sıcaklığında gerçekleştirilen temas açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Ch/PCL ve Ch/PCL/%15 Mz membranların PCL fiberler ile kaplı yüzeylerinden elde edilen su temas açısı değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. PCL fiberler ile kaplı membran yüzeylerinden elde edilen su temas açısı değerleri

Membran	Temas açısı (°)
Ch/PCL	129.9±1.43
Ch/PCL/%15 Mz	130.4±1.44

PCL fiber kaplı yüzeye damlatılan su damlası damla şeklini koruyarak yüzey üzerinde yayılmamıştır (Şekil 4.15 a). PCL hidrofobik bir polimer olduğundan bu beklenen bir sonuçtur. Ancak ağırlıkça % 15 Mz içeren PCL fiberler ile kaplı membran yüzeyinde de su damlası damla şeklini koruyarak yüzey üzerinde yayılmamıştır (Şekil 4.15 b). Metronidazol hidrofilik bir antibakteriyel ajandır. Ancak PCL fiberlerin yapısına eklenen metronidazol yüzeyin hidrofobik özelliğine herhangi bir etkide bulunmamıştır.



Şekil 4.15. Membran yüzeylerinde su temas açıları: (a) Ch/PCL membran, (b) Ch/PCL/%15 Mz membran

Xue ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada elektroçirime yöntemiyle farklı oranlarda metronidazol içeren nano fiber membranlar üretilmiştir. Metronidazol içermeyen ve ağırlıkça % 40 metronidazol içeren nanofiber membran yüzeylerine ait su temas açıları sırasıyla 129.64° ve 78.94° olarak ölçülmüş, metronidazol ilavesinin yapısında bulunan hidroksil ve polar imidazol halkası gibi fonksiyonel gruplardan dolayı membran yüzeyinin hidrofilik özelliğini arttırdığı belirtilmiştir [169].

4.4.4. Mekanik Dayanım Testi

Membranların mekanik dayanımlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çekme testi sonucunda elde edilen çekme dayanımı, elastik modül ve kopmadaki uzama değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çekme testinde kullanılan her iki membranın da kuru haldeki çekme dayanımı ve elastik modül değerleri ıslak haldeki değerlerinden daha yüksektir.

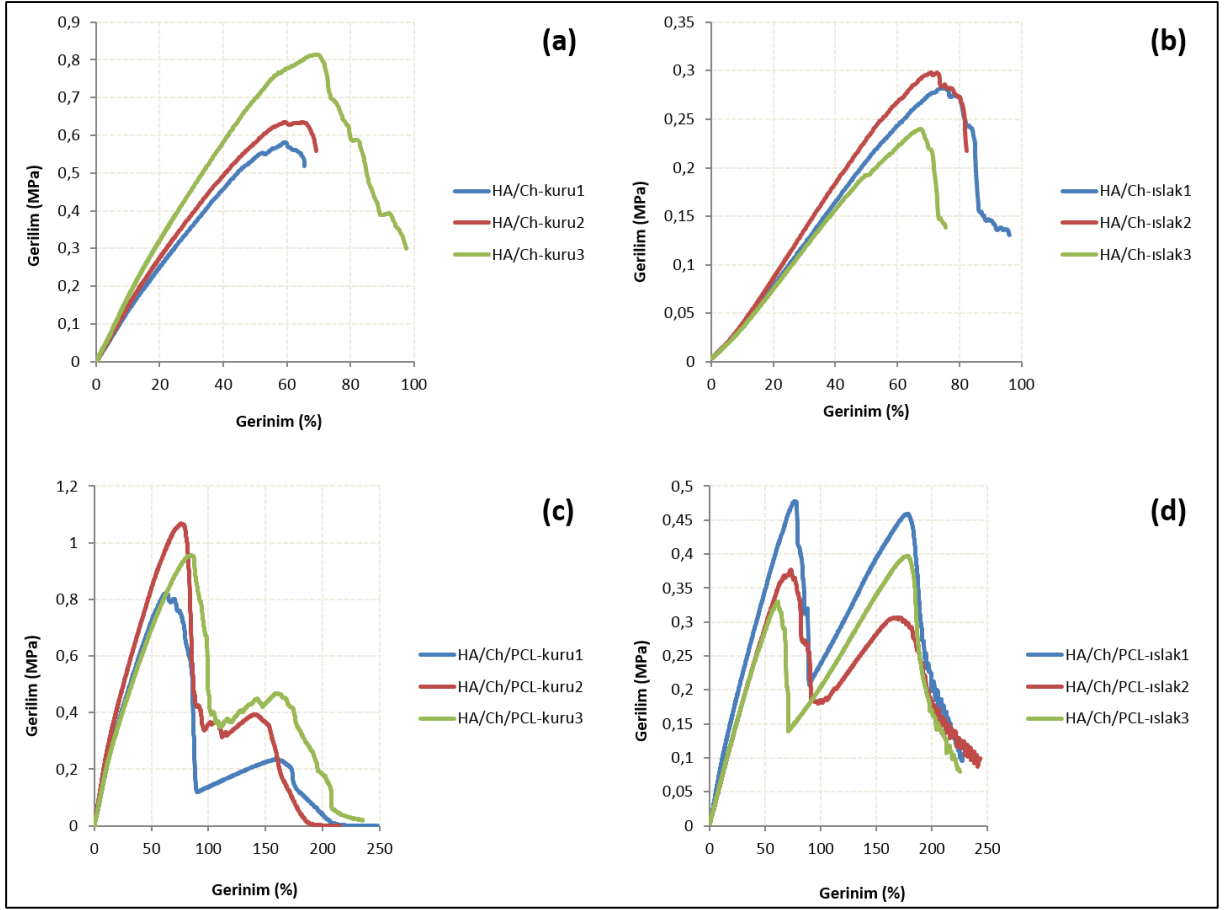
Çizelge 4.6. Membranların mekanik özellikleri

Membran	Elastik modül (MPa)	Çekme dayanımı (MPa)	Kopmadaki uzama %
HA/Ch ^a	1.550±0.207	0.677±0.122	64.0±4.6
HA/Ch ^b	0.370±0.029	0.273±0.030	71.0±4.0
HA/Ch/PCL ^a	2.090±0.238	0.948±0.123	74.0±11.0
HA/Ch/PCL ^b	0.725±0.136	0.418±0.053	75.5±3.5

Membranların ^a kuru, ^b ıslak haldeki mekanik özellikleri

Hem ıslak hem de kuru halde HA/Ch/PCL membran HA/Ch membrandan daha yüksek elastik modül ve çekme dayanımına sahiptir. Membran yüzeyinin PCL fiberler ile kaplanması sonucunda membranın mekanik dayanımının arttığı görülmektedir.

Membranlara ait hem kuru hem de ıslak haldeki gerilim-gerinim eğrileri incelendiğinde; HA/Ch membran gerilim-gerinim eğrisinde (Şekil 4.16 a,b) tek bir deformasyon bölgesine sahipken, HA/Ch/PCL membranın gerilim-gerinim eğrisinde (Şekil 4.16 c,d) iki tane deformasyon bölgesine sahip olduğu görülmektedir. Düşük gerinim değerlerinde kitosan membran kopmakta ve membran yüzeyindeki PCL fiberler uzamaya devam etmektedir. Yüksek gerinimlerde ise PCL fiberler kopmaktadır.



Şekil 4.16. HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranlara ait gerilim-gerinim eğrileri: (a) HA/Ch kuru haldeki, (b) HA/Ch ıslak haldeki, (c) HA/Ch/PCL kuru haldeki, (d) HA/Ch/ PCL ıslak haldeki

Doku rejenerasyonu uygulamaları için geliştirilen membranlar *in vivo* koşullardaki streslere karşı koyacak, cerrahi müdahale sırasında yeterli dayanma gerilimine sahip olacak ve oluşan yeni dokulara zarar vermeyecek şekilde yeterli mekanik dayanıma sahip olmak zorundadır. YDR yönteminde kullanılan membranlar implantasyon öncesinde vücut sıvısı ortamını taklit etmek amacıyla tuz çözeltisine daldırılmaktadır. Bu nedenle periodontal rejenerasyonda kullanılacak olan membranların ıslak haldeki mekanik özellikleri son derece önem taşımaktadır. Shi ve ark. tarafından yapılan çalışmada PCL nanofiber membranların kuru ve ıslak haldeki çekme dayanımları sırasıyla 9.99 ± 1.02 MPa ve 12.55 ± 2.82 MPa olarak ölçülmüştür. PCL membranın ıslak haldeki mekanik dayanımı kuru halden daha yüksek olarak bulunmuştur [67]. Liao ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada nano-karbonlanmış HA/kollajen/PLGA üç tabakadan oluşan kompozit bir membran üretilmiş ve üretilen membranın çekme dayanımı ve elastik modülü sırasıyla 9.7 ± 1.7 MPa ve 1.2 ± 0.5 GPa olarak bulunmuştur [59]. Teng ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada

kollajen/HA/kitosandan oluşan üç tabakalı bir bariyer membran üretilmiş ve üretilen membranın çekme dayanımı 9.7 ± 1.5 MPa ve elastik modülü 515.8 ± 103.9 MPa olarak bulunmuştur [7].

Bu bilgiler ışığında tez kapsamında geliştirilen bariyer membranın mekanik özelliklerinin literatürde üretilen bariyer membranlardan daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin, gliserin muamelesi ile membranın esnekliğindeki artışa bağlı olarak mekanik dayanımının azalması olduğu düşünülmektedir. YDR/YKR uygulamalarında geliştirilen membranların periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyelinin değerlendirilmesinde sadece mekanik dayanım değil, membranın sağlaması gereken tüm özellikler (epitel hücre göçünü engellemesi, kemik rejenerasyonunu sağlaması, biyobozunurluk süresi, mekanik dayanım ve kolay bir şekilde manipüle edilebilmesi) bir arada değerlendirilmelidir.

4.4.5. Enzimatik Bozunma

Biyobozunurluk doku mühendisliği uygulamalarında doku oluşumu açısından son derece önemli bir özelliktir [170]. Membranın bozunma hızı yeni dokunun oluşum hızıyla örtüşmeli yani, hasarlı bölge tamamen rejenere olduğunda membran tamamen bozunmuş olmalıdır [51]. Genel bilgiler kısmında da bahsedildiği gibi periodontal rejenerasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için membran en az 4-6 hafta ağız ortamında bulunmalıdır.

Kitosan lizozim tarafından deasetilasyon derecesine bağlı olarak kolaylıkla hidrolize olur [171]. Kitosanın deasetilasyon derecesi arttıkça kitosan yapısındaki lizozomal bağlanma için gerekli olan asetil gruplarının azaldığı ve buna bağlı olarak da lizozomal bozunmanın azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [170].

Bu çalışmada HA/Ch/PCL membranların lizozim ortamındaki bozunurlukları 28 günlük kültür süresi boyunca takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sadece DMEM ve DMEM/lizozim ortamlarında kültüre edilen membranların ağırlıklarında 28 gün boyunca herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Mota ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada kitosan/biyoaktif cam nano partikül kompozit membranlar PBS/lizozim ortamında kültüre edilmiş ve 14 hafta boyunca membranların ağırlıklarında herhangi bir değişim olmadığı ve *in vitro*'da oldukça yavaş bir şekilde bozdukları belirtilmiştir [2]. Hong ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada daldırma-çöktürme faz evirme yöntemi ile asimetrik gözenekli kitosan membranlar üretilmiş

ve membranların lizozim ortamında kültüre edilmiş ve 60 gün sonra membranın neredeyse tamamının bozunduğu gözlemlenmiş ve membranın *in vitro*'da 5-6 hafta yapısal bütünlüğünü koruduğu belirtilmiştir [62].

Sonuç olarak literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak geliştirilen membranın *in vitro* koşullarda oldukça yavaş bir şekilde bozunduğu belirlenmiştir.

4.5. Hücre Kültür Çalışmaları

Tez kapsamında geliştirilen bariyer membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyeli membranın sert doku ile temas edecek olan gözenekli kısmında MC3T3-E1 preosteoblast ve yumuşak doku ile temas edecek olan gözeneksiz kısmında ise MDBK hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları ile belirlenmiştir.

4.5.1. MC3T3-E1 Hücre Kültür Çalışması

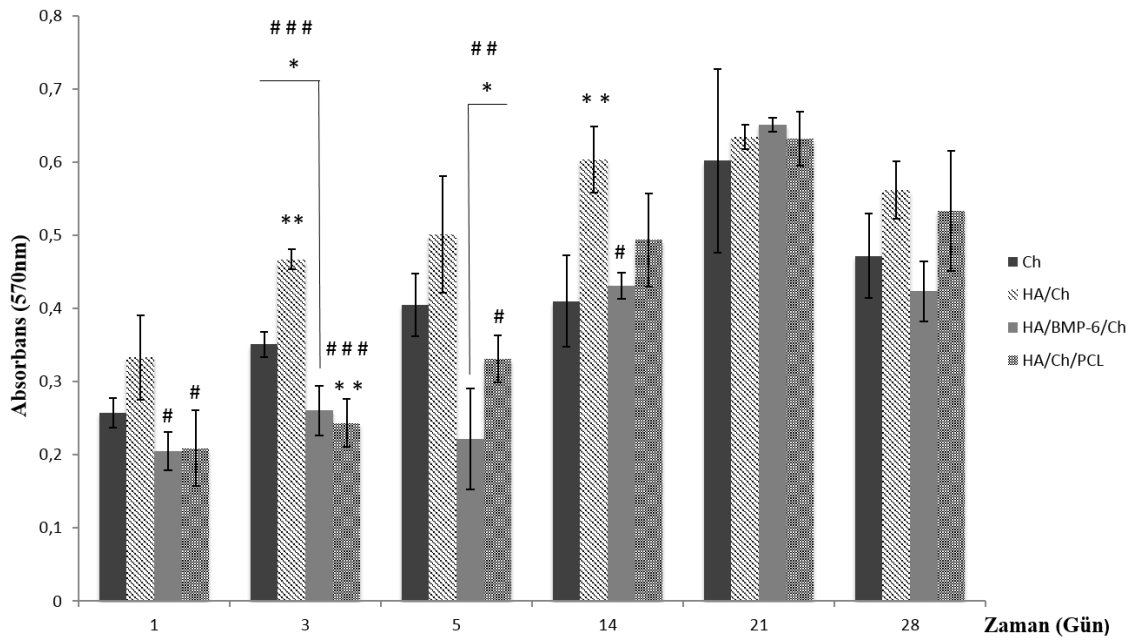
Tez kapsamında üretilen Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar kullanılarak fibroblastik yapıdaki fare preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı (İkilenme süresi: 36 sa, No: RCB1126, Riken Cell Bank, Japonya) ile 28 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan analizler ile preosteoblastik hücrelerin membranlar üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve osteoblastik farklılaşmaları incelenmiştir. HA kaplamanın ve BMP-6 varlığının farklılaşmaya etkisi diğer membranlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4.5.1.1. PrestoBlue Analizi

Hücrelerin dört farklı membran üzerindeki canlılıkları PrestoBlue analizi ile belirlenmiş ve sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.17'de verilmiştir. Hücre ekiminden sonra tüm membranlarda hücreler tutunmuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir. Kültürün birinci gününde kontrol grubu olan Ch membran ile diğer membranlar arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ancak, HA/Ch membrandaki hücre canlılığı HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlardan daha fazladır ($p < 0.05$). Kültürün üçüncü gününde en yüksek hücre canlılığına HA/Ch membranda ulaşılmıştır. HA/Ch membrandaki hücre canlılığı kontrol grubu olan Ch membrana göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.01$). Ancak HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlardaki hücre canlılığının hem Ch membrandan hem de HA/Ch membrandan daha az olduğu

gözlemlenmiştir. Kültürün beşinci gününde ise Ch membran ile HA/Ch membran arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. BMP-6 içeren membrandaki hücre canlılığı ise hem Ch membrandan ($p<0.05$) hem de HA/Ch membrandan ($p<0.01$) daha düşüktür. Ch ve HA/Ch/PCL membranlar arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiş ancak HA/Ch/PCL membrandaki hücre canlılığı HA/Ch membrandan düşük çıkmıştır ($p<0.05$). Kültürün on dördüncü gününde HA/Ch membrandaki hücre canlılığı Ch ($p<0.01$) ve HA/BM-6/Ch ($p<0.05$) membranlara göre anlamlı derecede artmıştır. HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar arasında ise hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu iki membranın da hücre ile temas eden yüzeyleri HA ile kaplıdır.



Şekil 4.17. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait PrestoBlue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu kitosan iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; kontrol grubu HA/Ch iken # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$)

21. ve 28. günlerde ise gruplar arasında anlamlı farklar gözlenmemiştir. Genel olarak PrestoBlue verileri incelendiğinde her dört grupta da 21 gün boyunca absorbans değerleri artmıştır. Sadece BMP-6 içeren grupta 5. günde bir önceki güne göre azalma gözlemlenmiştir. 21. günde hücre canlılığı bütün gruplarda en yüksek değerine ulaşmış ve 21. günden sonra tüm gruplarda hücre canlılığı azalmaya başlamıştır.

Sonuç olarak hücrelerin dört farklı membran yüzeyinde de tutunup çoğaldıkları, fakat en yüksek üreme hızını HA/Ch membranda gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca, BMP-6'nın MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin üremesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

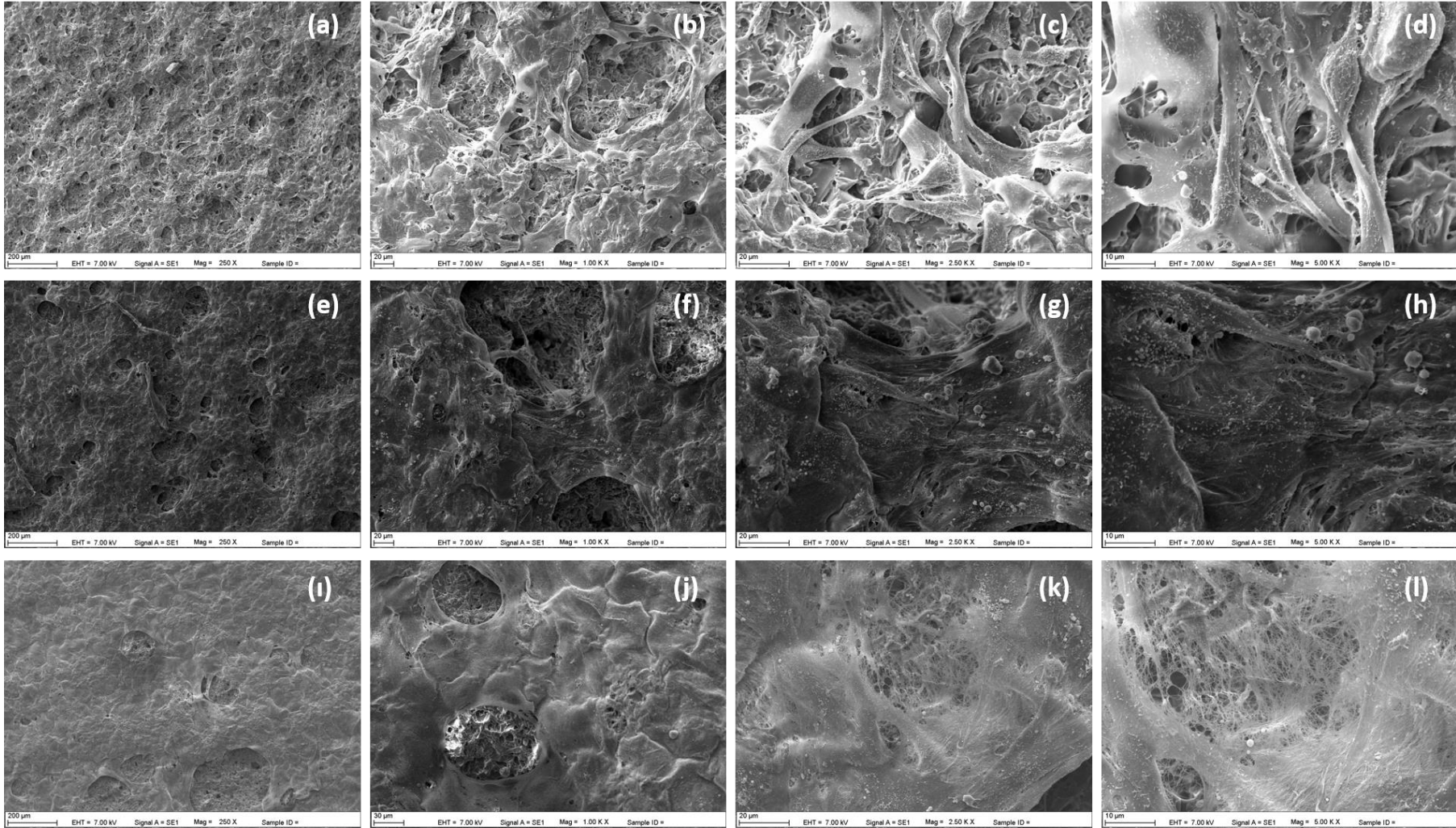
Kaynak G. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kitosan süpergözenekli hidrojel (SPH), kitosan HA/kaplama SPH ve kitosan HA/toz SPH doku iskeleleri üzerinde MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri kültüre edilmiş ve hücrelerin her üç iskeleye de tutunup çoğaldığı fakat en yüksek üreme hızını kitosan/HA kaplama SPH üzerinde gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sonuç kaplamadaki hidroksiapatitin sahip olduğu kemik benzeri yapı ile hücrelerin doğal ortamını taklit etmesi ile açıklanmıştır [92]. Kong ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kitosan/HA kompozit ve kitosan doku iskeleleri üretilmiş ve üretilen iskeleler 5xSBF çözeltisi ile muamele edilerek her iki iskelenin de yüzeyi HA ile kaplanmıştır. İskeleler üzerinde MC3T3-E1 hücreleri kültüre edilmiş ve hücrelerin apatit kaplı kompozit iskele üzerindeki üreme hızı apatit kaplı kitosan iskeleye göre daha yüksek bulunmuştur [172]. Akman ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin MC3T3-E1 hücreleri üzerine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kitosan, BMP-6 yüklü kitosan ve kitosan/BMP-6 kültür ortamına eklenen olmak üzere üç ayrı grup üzerinde MC3T3-E1 hücreleri kültüre edilmiştir. BMP-6 yüklü kitosan iskelenin hücre üremesini kitosan ve kitosan/BMP-6 kültür ortamına eklenen gruplarla benzer şekilde desteklediği sonucuna varılmıştır [133]. Grasser ve ark. BMP-6 muamelesinin, BMP-6 ile muamele edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında insan osteoblast hücrelerinin proliferasyonu üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığını göstermişlerdir [173]. Wan-Peng Xu ve ark. ise BMP-6 muamelesinin periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir [174]. Soran ve ark. tarafından yapılan çalışmada BMP-6 yüklü aljinat mikroküre içeren kitosan doku iskelesi üretilmiş ve üretilen iskeleler üzerinde kemik iliği kökenli sıçan mezenkimal kök hücreleri kültüre edilmiştir. Kontrol grupları oluşturmak amacıyla kitosan ve kitosan/BMP-6 kültür ortamına eklenen gruplar da kullanılmıştır. BMP-6 yüklü aljinat mikroküre içeren kitosan doku iskeleler üzerinde kültüre edilen hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin 7. günden sonra diğer gruplara göre önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir [1].

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada HA'nın varlığı literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak MC3T3-E1 hücrelerinin çoğalmasını desteklemiştir. Ancak BMP-6'nın hücre çoğalması üzerine herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir.

4.5.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Hücrelerin membran yüzeyine tutunması ve yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Tez kapsamında üretilen kitosan bazlı membranlar ile hücreler arasındaki etkileşim ve hücrelerin membran yüzeyindeki morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir.

Kitosan membranlar üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 2., 7. ve 14. gününe ait morfolojileri Şekil 4.18'de verilmiştir. Hücrelerin kitosan membran yüzeyine tutundukları, yayıldıkları ve sitoplazmik uzantıları ile birbirleri ile temas kurdukları Şekil 4.18 a-d'de görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.18 f'den de görüldüğü gibi hücreler sadece yüzeyde değil aynı zamanda içsel bağlantılı gözeneklerden membranın iç bölgelerine doğru yayılmaya devam etmişlerdir. Kültürün 7. gününde (Şekil 4.18 e) hücreler yüzeyde çoğalarak kendi hücre dışı matrikslerini üretmeye başlamışlardır. 7.günden itibaren hücre çoğalmasının hızla arttığı ve 14. günde (Şekil 4.18 ı) hücrelerin ve ürettikleri hücre dışı matriksin membran yüzeyini neredeyse tamamen kapladığı gözlenmiştir. Ayrıca 14. günde membran yüzeyinde kollajen fiberlerin oluşmaya başladığı belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.18 l)



Şekil 4.18. Kitosan membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 1,000X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 5,000X; (e) 7. gün, 250X; (f) 7. gün, 1,000X; (g) 7. gün, 2,500X; (h) 7. gün, 5,000X; (i) 14. gün, 250X; (j) 14. gün, 1,000X; (k) 14. gün, 2,500X; (l) 14. gün, 5,000X

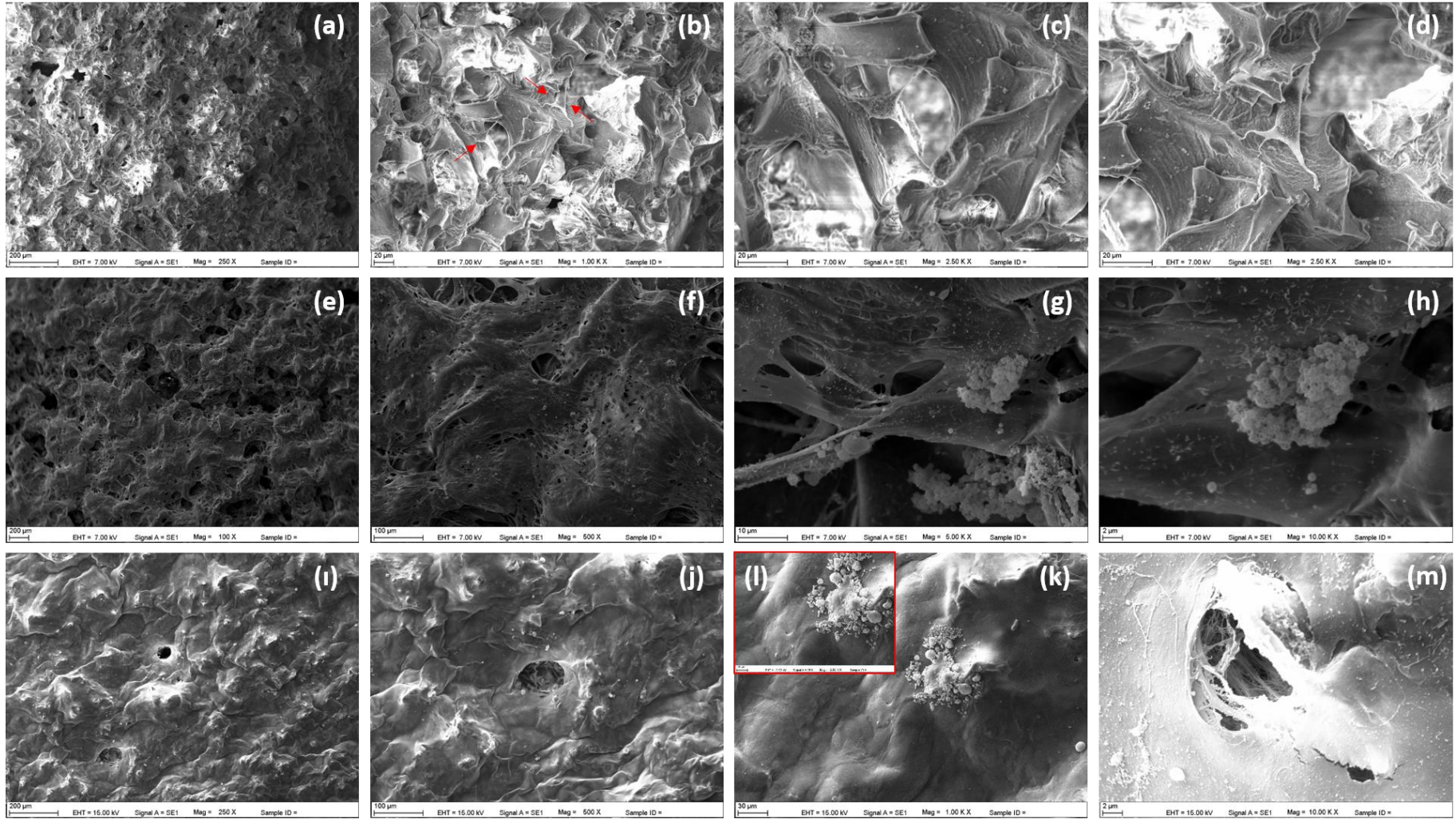
HA/Ch membranlar üzerinde yayılıp çoğalan hücrelerin 2., 7. ve 14. gün görüntüleri sırasıyla Şekil 4. 19 a-d, Şekil 4.19 e-h ve Şekil 4.19 ı-m'de verilmiştir. Kültürün 2. gününde hücreler sadece membran yüzeyine değil aynı zamanda sitoplazmik uzantıları ile gözeneklerin arasına da tutunmuşlardır (Şekil 4.19 b). Membran yüzeyinde bulunan HA kaplamalar ile hücrelerin etkileşimi SEM görüntülerinden net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.19 c,d). Bu görüntülerden HA kaplamanın hücre canlılığı ya da morfolojisi üzerine hiçbir olumsuz etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır.

Hücreler hidroksiapatitleri hem kimyasal hem de fiziksel açıdan uygun mikrotopografik yapılar olarak algılamaktadır. Bu algılamaya bağlı olarak hücreler sitoplazmik uzantıları ile HA partiküllerine doğru yönelmektedirler. Böylece hücreler HA'in osteoindüktif etkisi ile farklılaşmaya doğru gitmektedirler [92].

Kültürün 7. gününde hücre sayısında önemli ölçüde artış gözlemlenmiş ve hücreler yoğun bir şekilde kendi hücre dışı matrislerini salgılamaya başlamışlardır (Şekil 4.19 e,f). Kitosan membranda görülmeyen mineral kümeleri HA/Ch membranda 7. günden itibaren görülmeye başlanmıştır (Şekil 4.19 g,h). Mineral kümelere ait Ca/P oranı EDX analizi ile 2.03 ± 0.098 olarak hesaplanmıştır.

14. günde ise membran yüzeyi hücreler ve salgıladıkları hücre dışı matris ile tamamen kaplanmıştır (Şekil 4.19 ı,j). Ayrıca hücre membranlarının üzerinde 7. günde görülmeye başlanan mineral birikimleri 14. günde de görülmüştür (Şekil 4.19 k,l). Kitosan membranda 14. günde oluşmaya başlayan kollajen fiberler HA/Ch membranda tamamen oluşmuştur. Şekil 4.19 m'den kollajen fiberler net bir şekilde görülmektedir.

Sonuç olarak HA/Ch membran MC3T3-E1 hücrelerinin tutunmasını, yayılmasını, çoğalmasını ve osteoblastik farklılaşmasını HA'in sağladığı osteoindüktif ve osteokondüktif etki ile kitosan membrana göre daha fazla desteklemektedir.



Şekil 4.19. HA/Ch membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 1,000X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 7. gün, 100X; (f) 7. gün, 500X; (g) 7. gün, 5,000X; (h) 7. gün, 10,000X; (i) 14. gün, 250X; (j) 14. gün, 500X; (k) 14. gün, 1,000X; (l) 14. gün, 2,500X; (m) 14. gün, 10,000X

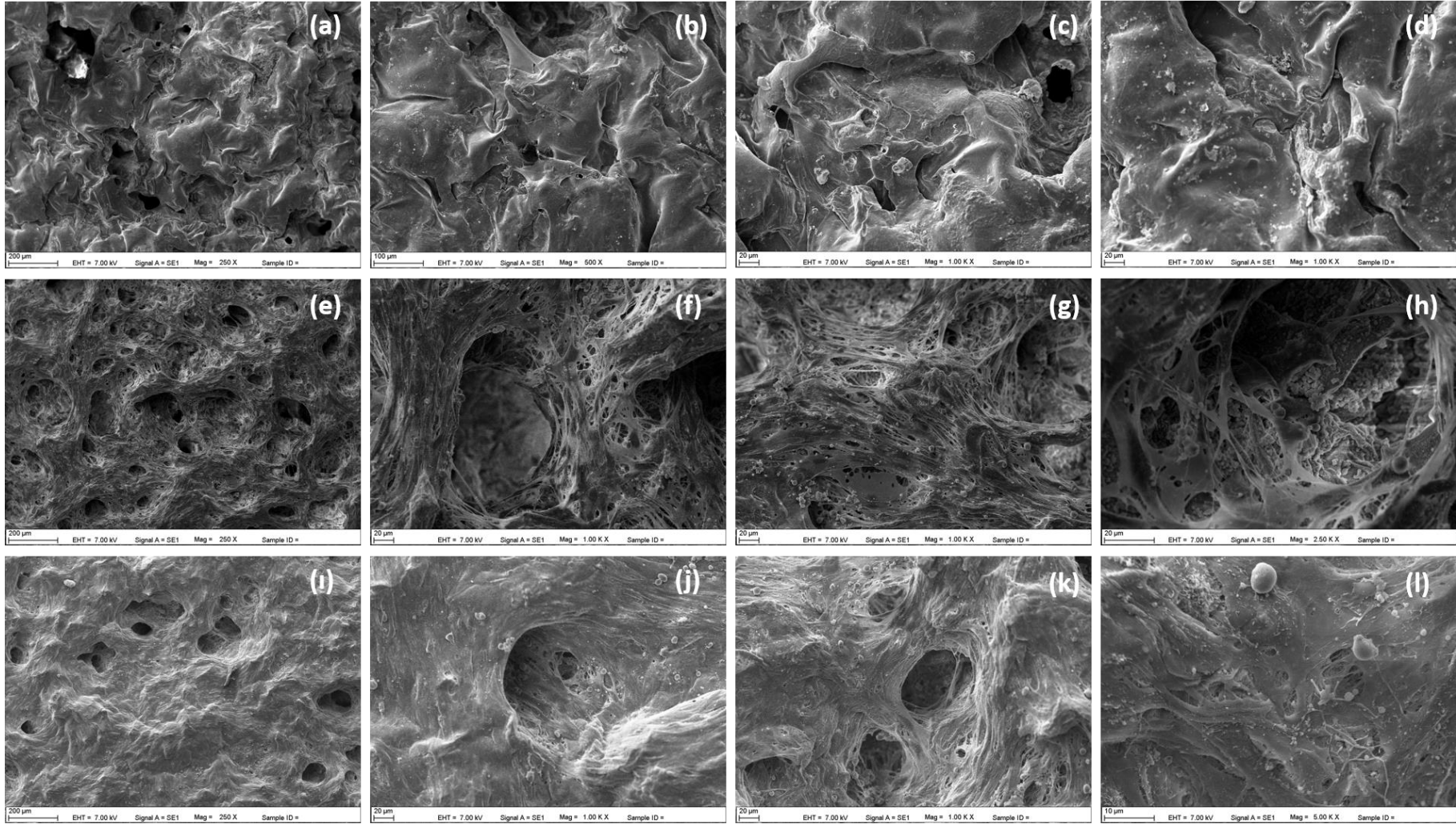
HA/BMP-6/Ch membranlar üzerinde yayılıp çoğalan hücrelerin 2., 7. ve 14. gün görüntüleri sırasıyla Şekil 4.20 a-d, Şekil 4.20 e-h ve Şekil 4.20 ı-l'de verilmiştir. Membran yüzeyindeki kaplamanın net bir biçimde görülmesi (Şekil 4.20 d,h) mikrodalga ile yapılan kaplamanın membran üzerindeki kararlılığının göstergesidir. Şekil 4.20 h'den hücrelerin HA partikülleri ile etkileşime girdikleri görülmektedir. BMP-6'nın varlığı 7.günden itibaren kendini göstermeye başlamıştır. Kitosan ve HA/Ch membranlarla karşılaştırıldığında, HA/Ch/BMP-6 membranda 7. günde oldukça yoğun bir hücre dışı matris üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.20 e). 14. günde hücre sayısının artmasıyla hücreler tarafından salgılanan hücre dışı matris daha da artmış ve membran yüzeyi neredeyse tamamen hücreler ve hücre dışı matris ile kaplanmıştır.

BMP-6 uygulamasının preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin hücre dışı matris üretmeleri üzerinde hem hızlandırıcı hem de arttırıcı etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

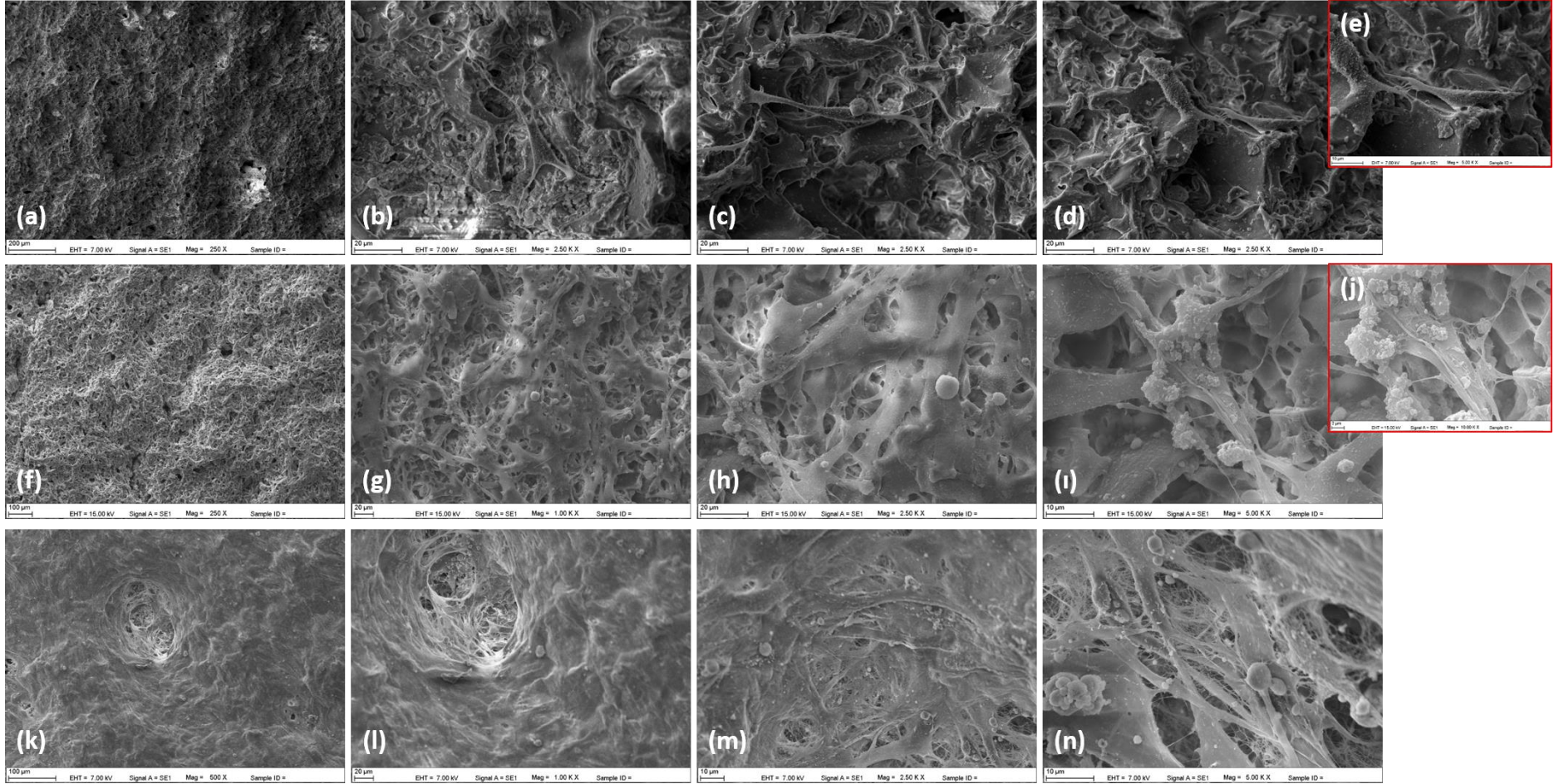
Akman ve ark. tarafından yapılan çalışmada BMP-6 uygulamasının MC3T3-E1 hücreleri tarafından sentezlenen hücre dışı matris miktarını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Kontrol grubu olan kitosan iskeleye göre BMP-6 içeren gruplarda daha yoğun bir hücre dışı matris sentezi gözlemlenmiştir. Ancak en yoğun hücre dışı matrise BMP-6 yüklü kitosan iskelede rastlanılmıştır. Kitosan iskelede 28. günde, kitosan/BMP-6 kültür ortamına eklenen grupta ise 21. günde gözlenen hücre dışı matris yoğunluğu BMP-6 yüklü doku iskelesinde 7. günde gözlenmiştir [133].

Hücre dışı matris osteoblastik hücrelerin hücresel fonksiyonlarının düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Tip I kollajen başta olmak üzere hücre dışı matris bileşenlerinin sentezlenmesi mineralizasyon açısından gereklidir. Hücre dışı matris bileşenleri sadece üzerlerinde mineral birikimlerinin olduğu bir fiziksel şablon değildir. Aynı zamanda hücre yapısının değişmesine ve osteoblastların gen ekspresyonlarına da katkıda bulunmaktadırlar [133].

Sonuç olarak BMP-6 uygulaması MC3T3-E1 hücre üremesi üzerine etki etmezken hücreler tarafından sentezlenen hücre dışı matris miktarını arttırmıştır. HA/Ch membran MC3T3-E1 hücrelerinin tutunmasını, yayılması, çoğalmasını ve farklılaşmasını BMP-6 olmadan başarılı bir şekilde desteklemektedir. Ancak hücre dışı matrisin hücreler üzerine olan etkisi göz önüne alındığında HA kaplı membran yüzeyinin BMP-6 ile zenginleştirilmesi hücresel fonksiyonları daha da desteklemektedir.



Şekil 4.20. HA/BMP-6/Ch membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 1,000X; (d) 2. gün, 1,000X; (e) 7. gün, 250X; (f) 7. gün, 1,000X; (g) 7. gün, 1,000X; (h) 7. gün, 2,500X; (i) 14. gün, 250X; (j) 14. gün, 1,000X; (k) 14. gün, 1,000X; (l) 14. gün, 5,000X



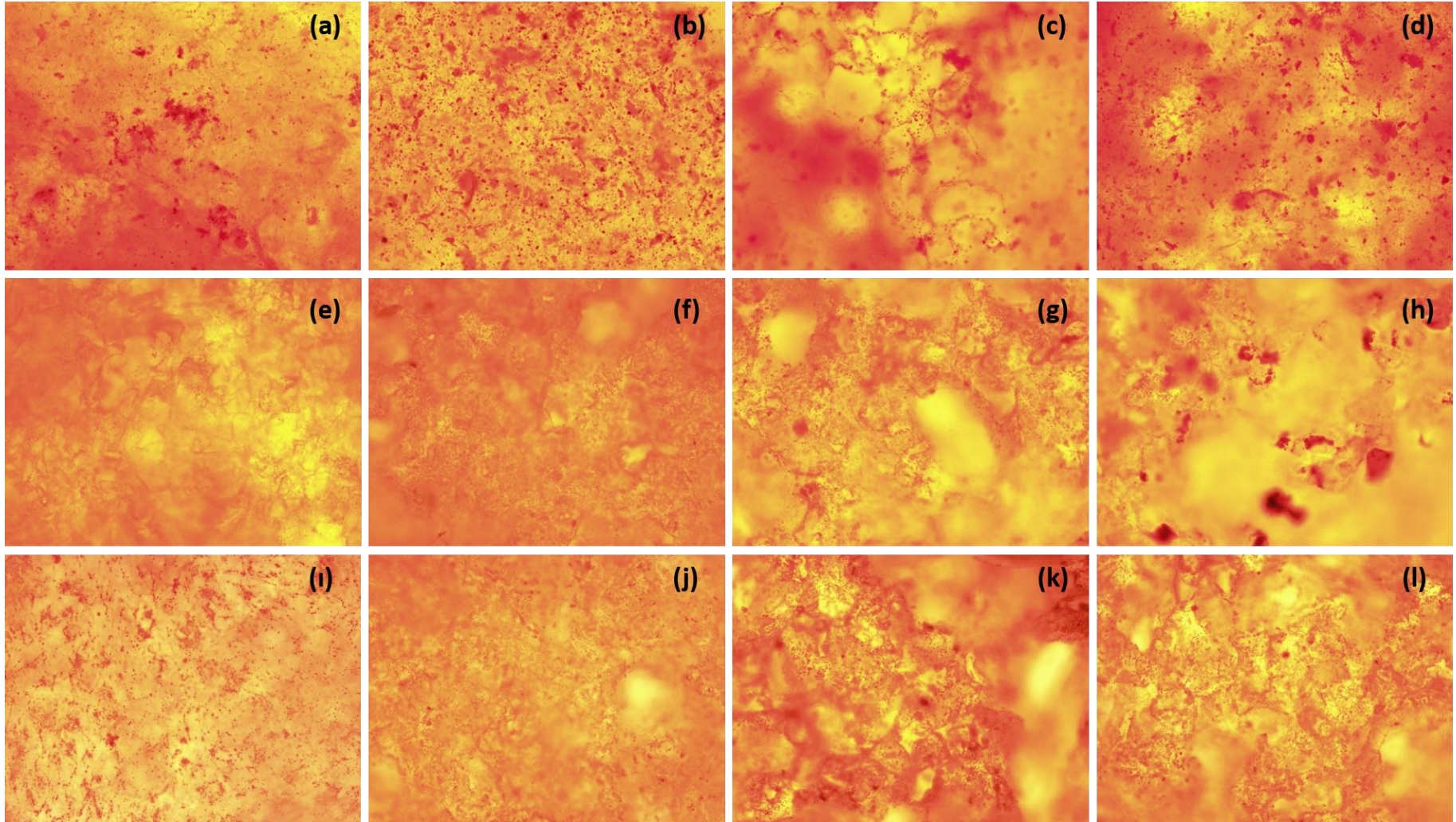
Şekil 4.21. HA/Ch/PCL membran üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 2,500X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 2. gün, 5,000X; (f) 7. gün, 250X; (g) 7. gün, 1,000X; (h) 7. gün, 2,500X; (i) 7. gün, 5,000X; (j) 7. gün, 10,000X; (k) 14. gün, 500X; (l) 14. gün, 1,000X; (m) 14. gün, 2,500X; (n) 14. gün, 5,000X

HA/Ch/PCL membranlar üzerinde yayılıp çoğalan hücrelerin 2., 7. ve 14. gün görüntüleri sırasıyla Şekil 4.21 a-e, Şekil 4.21 f-j ve Şekil 4.21 k-n'de verilmiştir. HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranların MC3T3-E1 hücreleri ile etkileşen yüzeyleri aynıdır. Membran yüzeyindeki HA kaplama ve hücrelerin HA partikülleri ile olan etkileşimi Şekil 4.21 b'den açıkça görülmektedir. 2. günde hücreler sitoplazmik uzantıları aracılığıyla membran yüzeyinde yayılmış ve birbirleri ile temas kurmuşlardır (Şekil 4.21 d,e). 7. günde hücreler çoğalmış ve kendi hücre dışı matrislerini üreterek membran yüzeyini önemli ölçüde kaplamışlardır. HA/Ch membrana benzer şekilde 7. günde mineral kümeleri görülmektedir (Şekil 4.21 ı,j). 14. günde ise membran yüzeyi hücreler ve salgıladıkları hücre dışı matrisle tamamen kaplanmıştır (Şekil 4.21 k) ve aynı zamanda mineral birikimleri 14. günde de görülmeye devam etmiştir (Şekil 4.21 h).

4.5.1.3. Alkalin Fosfataz (ALP) Boyaması

Osteoblastlar farklılaşmaları sırasında osteopontin, alkalin fosfataz ve osteokalsin gibi farklılaşmalarının belirteci olan bir takım genler sentezlerler. ALP aktivitesi osteoblastik farklılaşmanın erken dönem belirteçlerindedir [175]. ALP boyama tutunan hücrelerde ALP enzim aktivitesinin kırmızı renge boyandığı bir yöntemdir. Kitosan bazlı membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine kültürün 7. 14. ve 21. günlerinde ALP boyaması yapılmıştır. Hücreler sonrasında optik mikroskop ile incelenmiş ve membran yüzeyindeki hücrelere ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir.

Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde ALP enzim aktivitesinin 7. günde tüm gruplarda 14. ve 21. günlere kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. 7. günde ALP enzim aktivitesi HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlarda Ch membrana göre daha yüksektir.

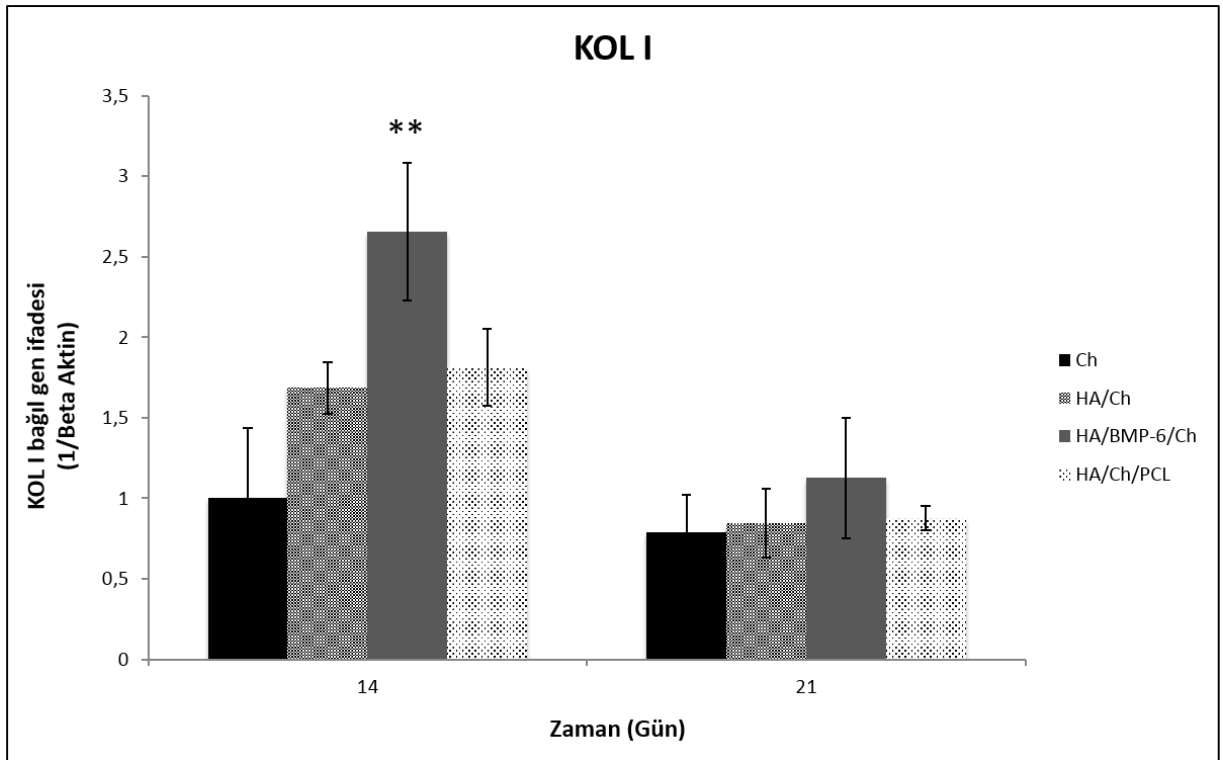


Şekil 4.22. Kitosan bazlı membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP boyama sonrası optik mikroskop görüntüleri: Ch membran: (a) 7. gün, 20X; (e) 14. gün, 20X; (i) 21. gün, 20X; HA/Ch membran: (b) 7. gün, 20X; (f) 14. gün, 20X; (j) 21. gün, 20X; HA/BMP-6/Ch membran: (c) 7. gün, 20X; (g) 14. gün, 20X; (k) 21. gün, 20X; HA/Ch/PCL membran: (d) 7. gün, 20X; (h) 14. gün, 20X; (l) 21. gün, 20X

4.5.1.4. RT-PCR Analizleri

Osteojenik farklılaşma sırasında kollajen I (KOL I), osteonektin, kemik siyaloproteini, osteopontin (OPN) ve osteokalsin (OCN) gibi genlerin ekspresyonlarında artış gözlenmektedir [176]. Sunulan tez çalışması kapsamında membranlara ekilen hücrelerin osteoblastik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla hücrelerdeki KOL I, RunX2, OCN ve OPN gen ifadeleri RT-PCR analizi ile belirlenmiştir.

Yeni kemiğin oluşumu sırasında öncelikli olarak hücreler çoğalmakta ve çoğalan osteoblastlar, osteoblastların birincil gen ürünü olan KOL I salgılamaktadır. Kemik hücre dışı matrisi çoğunlukla KOL I'den oluşmaktadır. KOL I kollajenöz olmayan proteinlerin birikimi için bir alt yapı oluşturmakta ve aynı zamanda kalsifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Tip I kollajen üretimi osteoblastların farklılaşma ve olgunlaşma dönemlerinde azalmaktadır [91,176].

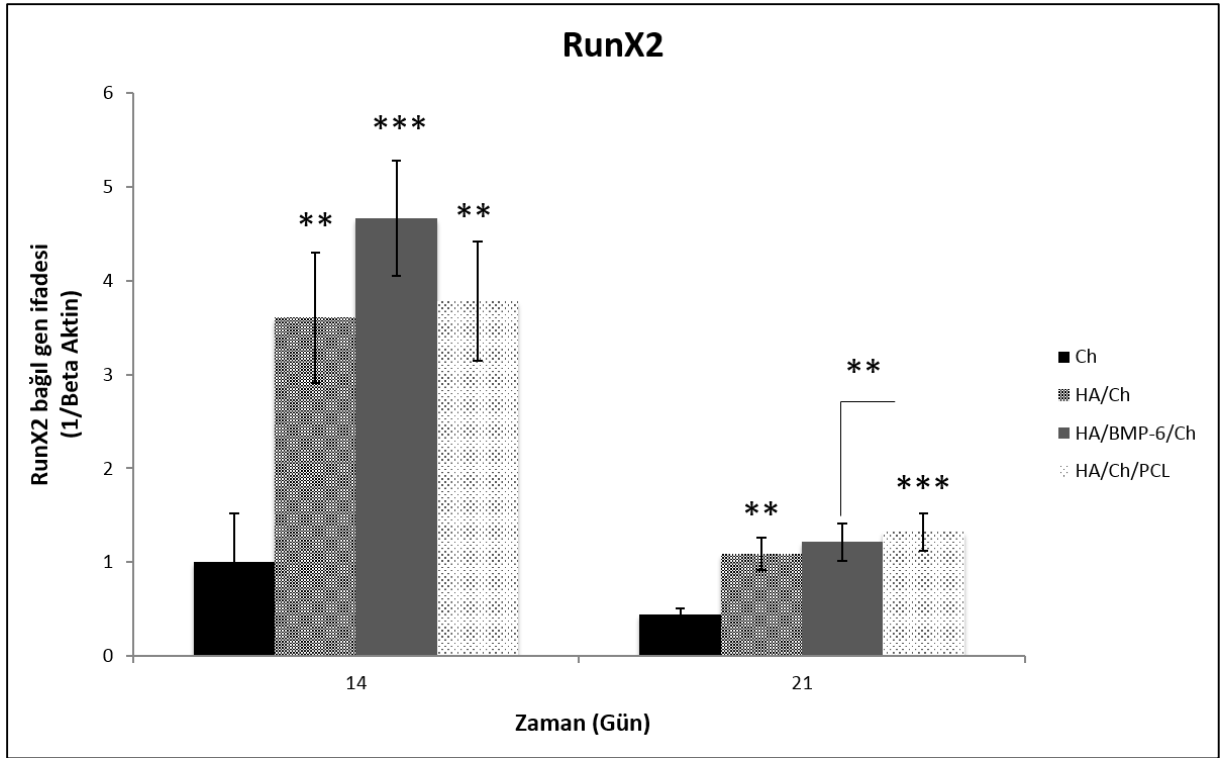


Şekil 4.23. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl kollajen I gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken ** p<0.01)

Membranlar üzerindeki hücrelerin KOL I ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.23) tüm gruplarda kollajen I gen ekspresyonu 21. günle kıyaslandığında 14. günde en yüksektir. 14. gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde ise kitosana göre HA/BMP-6/Ch grubunun

KOL I ekspresyonunun yaklaşık 1.7 kat fazla olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Diğer gruplar arasında ise herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). 21. günde tüm grupların kollajen-I ekspresyonları azalmış ve gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır ($p>0.05$).

RunX2 osteoblastik farklılaşma için gerekli olan bir düzenleyici faktördür. Yapılan çalışmalarla RunX2 gen mutasyonuna sahip farelerde kemik doku oluşumunun gözlenmediği kanıtlanmıştır [177]. RunX2 osteojenik farklılaşmanın erken dönemlerinde kemik matris proteinlerinin ekspresyonlarını tetikler ancak, olgun osteoblastlarda bu genlerin ekspresyonu için gerekli değildir [178]. Membranlar üzerindeki hücrelerin RunX2 gen ifadeleri Şekil 4.24’de verilmiştir.

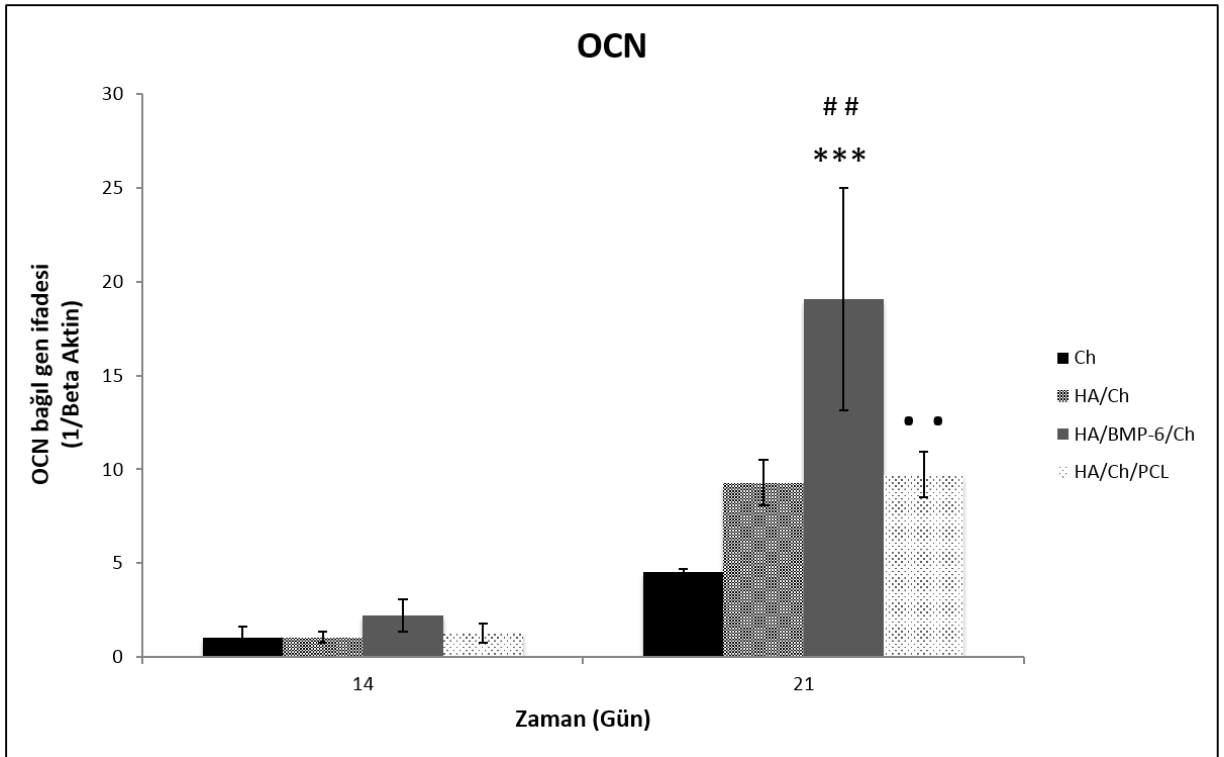


Şekil 4.24. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl RunX2 gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu kitosan iken ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Şekil 4.24’den de görüldüğü gibi RunX2 gen ekspresyonu tüm gruplarda 14. günde en yüksektir. HA kaplı gruplarda gen ekspresyon seviyesinin kitosan ile karşılaştırıldığında, oldukça anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$ ve $p<0.001$). HA partiküllerinin preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını desteklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [179]. RunX2 gen ekspresyon seviyelerinin

kitosana göre HA/Ch ve HA/Ch/PCL grubunda yaklaşık 3 kat, HA/BMP-6/Ch grubunda ise yaklaşık 4 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Kaynak G. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da 14. günde RunX2 gen ekspresyon seviyesinin kitosan iskeleye göre HA/kaplama SPH iskelede 3.5 kat artmıştır [92]. Ancak HA/Ch ile HA/BMP-6/Ch grupları arasında herhangi bir anlamlı farklılık yoktur. 14. günde BMP-6'nın RunX2 gen ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. 21. günde tüm gruplardaki gen ekspresyon seviyesi azalmış ve kitosana göre RunX2 gen ekspresyon seviyelerinin HA/Ch grubunda 0.65, HA/BMP-6/Ch grubunda 0.77 ve HA/Ch/PCL grubunda ise 0.88 kat fazla olduğu belirlenmiştir. 14. günle paralel olarak 21. günde de BMP-6'nın gen ifadesi üzerine etkisi gözlenmemiştir.

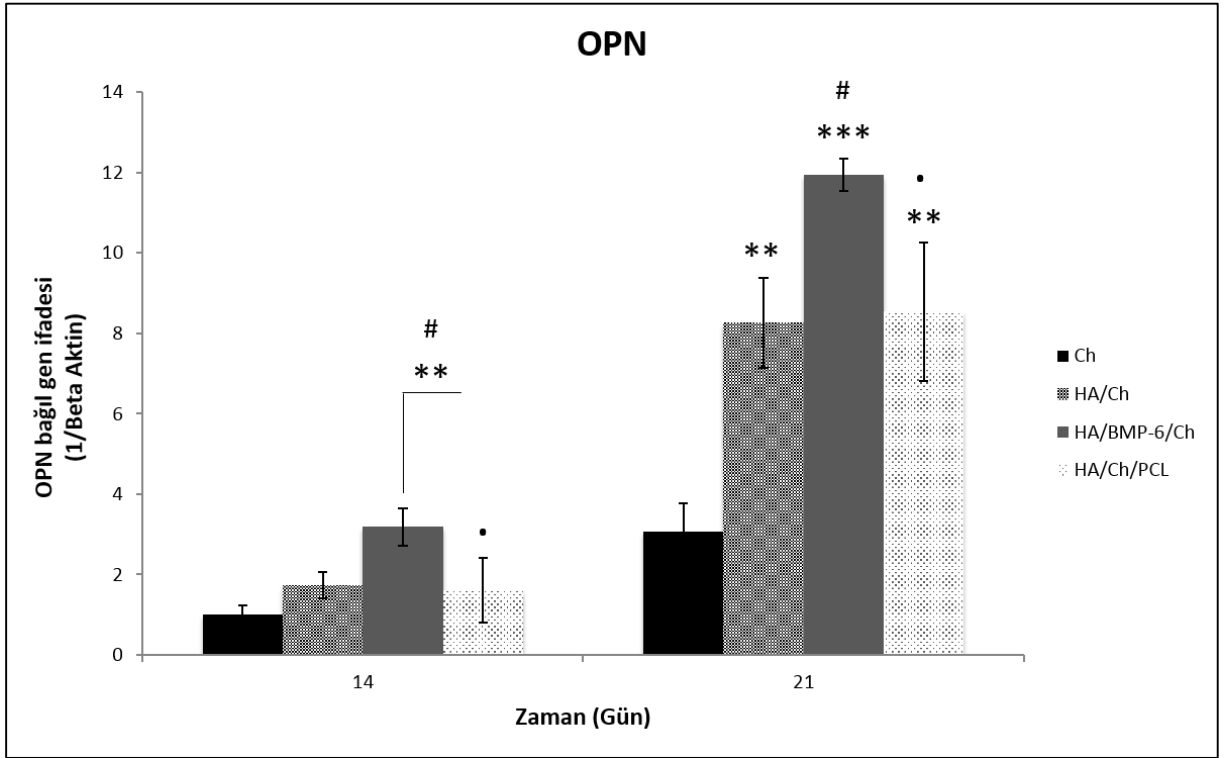
Osteojenik farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkan osteokalsinin *in vivo*'daki rolü kemik oluşumunu inhibe etmek ve kemik minerallerinin olgunlaşmasını uyarmaktır. Osteokalsin *in vitro* koşullarda ise çekirdeklenmeyi geciktirici ve aşırı kristal oluşumunu önleyici şekilde rol oynamaktadır [176]. Osteokalsin ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.25) 14. günde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca OCN gen ekspresyon seviyesi tüm gruplarda 21. günle karşılaştırıldığında en düşüktür.



Şekil 4.25. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl OCN gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu kitosan iken *** $p<0.001$, kontrol grubu HA/Ch iken ## $p<0.01$, kontrol grubu HA/BMP-6/Ch iken .. $p<0.01$)

21. günde ise tüm gruplarda OCN gen ekspresyon seviyesi artmış ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Kitosan membrana göre, HA/BMP-6/Ch membranda gen ekspresyon seviyesinin yaklaşık 15 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HA/BMP-6/Ch membrandaki OCN gen ekspresyon seviyesi HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranlardan anlamlı ölçüde fazladır ($p<0.01$). Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark yoktur. Şekil 4.25’den BMP-6’nın kültürün 21. gününde OCN gen ekspresyonuna olan etkisi açıkça görülmektedir. Yukarıda verilen bilgiler değerlendirildiğinde BMP-6 içeren gruptaki OCN gen ekspresyon seviyesi hem kitosan hem de HA kaplı diğer gruplardan daha yüksektir.

OPN kemiğin yeniden yapılandırılmasında rol oynayan önemli bir aracı proteindir. OPN kemik gelişimi sırasında diğer kollajenöz olmayan proteinlerin ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldığında osteoblastik hücreler tarafından en göze çarpıcı şekilde sentezlenen proteinlerden bir tanesidir. Osteojenik farklılaşmanın geç dönemlerinde mineral kristallerinin büyümesini inhibe ederek negatif düzenleyici olarak görev yapar [180].



Şekil 4.26. Ch, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl OPN gen ifadesi grafiği (istatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu kitosan iken ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, kontrol grubu HA/Ch iken # $p<0.05$, kontrol grubu HA/BMP-6/Ch iken . $p<0.05$)

Osteopontin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.26) 14. günde tüm gruplarda gen ekspresyon seviyesinin 21. günden daha düşük olduğu belirlenmiştir. HA/BMP-6/Ch

gruptaki gen ekspresyon seviyesi kitosana ($p<0.01$) ve diğer gruplara ($p<0.05$) göre anlamlı derecede fazladır. Ch, HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 21. günde ise tüm gruplarda gen ekspresyon seviyesi artmıştır. Kitosana göre, HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlardan ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 5.2, 9 ve 5.5 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca BMP-6 içeren gruptaki gen ekspresyonu HA kaplı diğer gruplardan anlamlı ölçüde fazladır ($p<0.05$). 21. günde hem hidroksiapatitin hem de BMP-6'nın OPN gen ekspresyonu üzerine olan etkisi net bir şekilde görülmektedir. Sonuç olarak HA özellikle BMP-6 uygulaması OPN ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmaktadır.

4.5.2. MDBK Hücre Kültür Çalışması

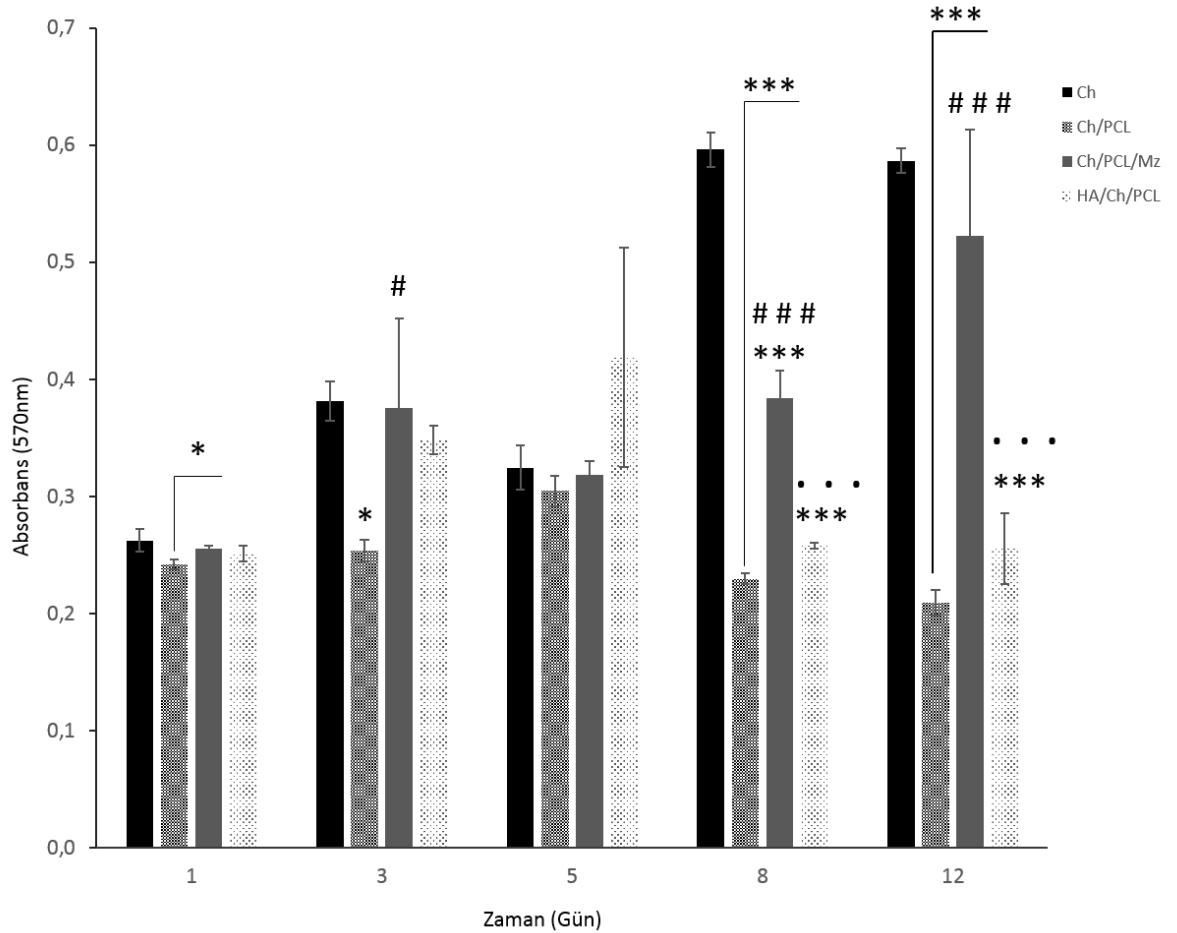
Tez kapsamında üretilen Ch, Ch/PCL, Ch/PCL/Mz ve HA/Ch/PCL membranlar kullanılarak epitel yapıdaki MDBK hücre hattı (İkilenme süresi: 22 sa, HÜKÜK No: 95121801, Foot and Mouth Disease Institute, Türkiye) ile 12 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Yapılan analizler ile epitel yapıdaki hücrelerin membranlar üzerindeki canlılıkları ve morfolojileri incelenmiştir.

4.5.2.1. PrestoBlue Analizi

MDBK hücrelerinin dört farklı membran üzerindeki canlılıkları kültürün 1., 3., 5., 8. ve 12. günlerinde gerçekleştirilen PrestoBlue analizi ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.27'de verilmiştir. 1. güne ait PrestoBlue değerleri incelendiğinde Ch/PCL membrandaki hücre canlılığı kontrol grubu olan kitosandan anlamlı derecede düşüktür ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. 3. günde tüm gruplarda hücre canlılığı 1. güne göre artmıştır. Ch/PCL membrandaki hücre canlılığı diğer gruplara göre daha az miktarda artmıştır. 1. günle paralel olarak Ch/PCL membrandaki hücre canlılığı kitosandan azdır ($p<0.05$). Ayrıca Ch/PCL/Mz membrandaki hücre canlılığı Ch/PCL membrandan anlamlı ölçüde fazladır ($p<0.05$). 5. günde gruplar arasında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ($p>0.05$). 8. günde ise kitosan ve Ch/PCL/Mz membranlardan hücre canlılığı 5. güne göre artarken diğer gruplarda azalmıştır. En yüksek hücre canlılığına kitosan membranda ulaşılmıştır. PCL fiberler ile kaplı gruplar arasında ise en yüksek hücre canlılığına Mz içeren grupta ulaşılmıştır. 12 günde Ch/PCL/Mz dışındaki tüm gruplarda hücre canlılığı 8. güne göre azalmıştır. Kitosan ve Ch/PCL/Mz membranlar arasında hücre canlılığı bakımından anlamlı farklılığa rastlanmazken,

Ch/PCL/Mz membrandaki hücre canlılığı diğer PCL kaplı membranlardan yüksek bulunmuştur.

PrestoBlue grafiği incelendiğinde Ch/PCL ve HA/Ch/PCL membranlar arasında hücre canlılığı açısından anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır. Bu membranların hücre ile temas eden yüzeyleri aynı olduğu için bu beklenen bir sonuçtur. Ayrıca metronidazol yüklü PCL fiberler ile kaplı membranda hücre canlılığı Ch/PCL membrana göre daha yüksektir. Metronidazol MDBK hücrelerinin üreme hızını arttırmıştır. Bunun nedeninin PCL fiberlerden salınan metronidazolün fiber yüzeyinde birikerek yüzey pürüzlülüğünü artırması ve metronidazol yüklü fiberlerde fiber çapının azalmasına bağlı olarak yüzey alanının artması olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.27. Ch, Ch/PCL, Ch/PCL/Mz ve HA/Ch/PCL membranlar üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait PrestoBlue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu Ch/PCL iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu Ch/PCL/Mz iken . p<0.05, .. p<0.01, ... p<0.001)

Shi ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada L929 hücrelerinin metronidazol içeren PCL nanofiber membran üzerindeki üreme hızı, PCL nanofiber membran üzerindeki üreme hızından yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin, PCL yapısına eklenen metronidazolün yüzeyin hidrofilik özelliğini arttırması ve bozunma sırasında açığa çıkan ilaç kristallerinin fiber yüzeyinde birikerek yüzeyin pürüzlülüğünü arttırması olabileceği belirtilmiştir [67].

4.5.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Tez kapsamında üretilen kitosan bazlı membranlar ile hücreler arasındaki etkileşim ve hücrelerin membran yüzeyindeki morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir.

Kitosan membran yüzeyinde kültüre edilen MDBK hücrelerine ait 2. ve 8. gün SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.28 a-e ve Şekil 4.28 f,g'de verilmiştir. Kültürün 2. gününde hücreler membran yüzeyine tutunmuş ve sitoplazmik uzantıları ile membran yüzeyinde yayılmışlardır (Şekil 4.28 b-e). Ancak 8. günde membran yüzeyinde hücre çoğalması gerçekleşmemiş ve buna bağlı olarak da hücre dışı matris oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.28 f,g). Kitosan membranın gözeneksiz yüzeyi MDBK hücrelerinin çoğalmasını desteklememiştir.

Ch/PCL membran yüzeyinde kültüre edilen MDBK hücrelerine ait 2. ve 8. gün SEM görüntüleri Şekil 4.29 a-d ve Şekil 4.29 e-f'de verilmiştir. 2. günde hücreler PCL fiberler ile kaplı membran yüzeyine tutunmuş ancak yüzeyde yayılmamışlardır. 8. günde de kitosan membranla benzer şekilde hücreye ve hücre dışı matris üretimine rastlanmamıştır.

Ch/PCL/Mz membran üzerinde kültüre edilen MDBK hücrelerine ait 2. ve 8. gün SEM görüntüleri (Şekil 4.30) incelendiğinde, kültürün 2. gününde hücreler ağırlıkça %15 Mz yüklü PCL fiberler ile kaplı membran yüzeyinde yayılmış ve sitoplazmik uzantıları aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurmuşlardır (Şekil 4.30 b). Yüzeye tutunduğu halde yayılmayan hücre grupları da mevcuttur (Şekil 4.30 c,d). Metronidazol'ün hücreler üzerine olumsuz bir etkisi gözlenmemiştir. PCL fiberler ile kaplı membran yüzeyinde 2. ve 8. günde yayılan hücreye rastlanmazken hücreler antibakteriyel ajan yüklü fiberler ile kaplı yüzeyde yayılmış, hatta 8. günde membran yüzeyinde çoğalarak kendi hücre dışı matrislerinin üretmeye başlamışlardır (Şekil 4.30 e-h).

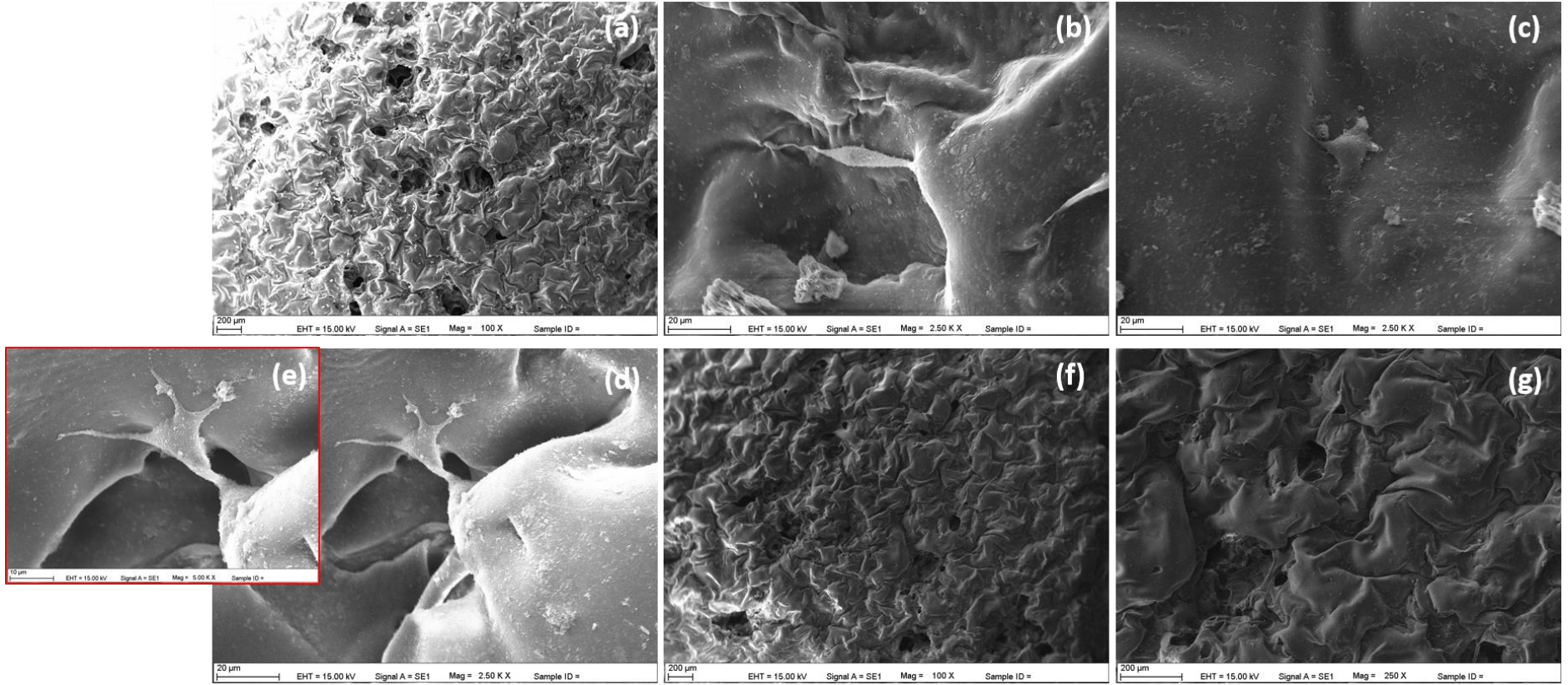
Shi ve ark. PCL, PCL/metronidazol, PCL/jelatin/Mz ve PCL/jelatin/Mz/asetik asit nanofiber membranlar üzerinde L929 hücrelerini kültüre ederek sitotoksikite çalışmaları yapmışlar ve metronidazolün hücre çoğalmasına herhangi bir negatif etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak, PCL/Mz membran üzerinde insan periodontal ligament fibroblast (hPDLF) ve sıçan osteoblast benzeri hücrelerini (ROS) kültüre ederek sitotoksosite çalışmaları yapmışlardır. Benzer şekilde metronidazol varlığının hPDLF ve ROS hücrelerinin canlılığını olumsuz yönde etkilemediği ve kontrol grubuna göre her iki hücre türünün bağıl üreme hızının %100'den büyük olduğu belirtilmiştir [67].

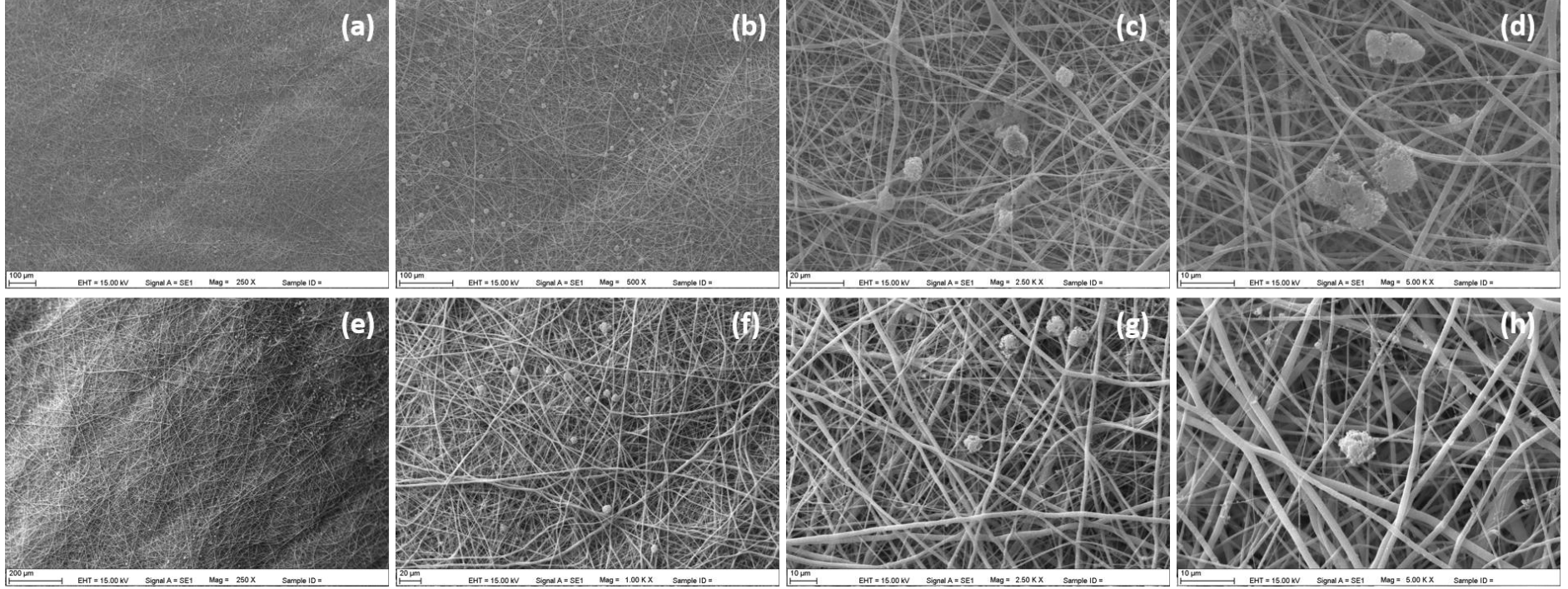
Metronidazol hidrofilik bir antibakteriyel ajan olmasına rağmen, PCL fiberlerin yapısına metronidazolün katılmasıyla yüzeyin hidrofobik özelliğinde herhangi bir değişim gerçekleşmemiştir. Ancak Ch/PCL/Mz membran yüzeyi MDBK hücrelerinin yayılmasını ve çoğalmasını Ch/PCL membran yüzeyinden daha fazla desteklemektedir. Fiberlerin yapısına metronidazolün katılmasıyla PCL fiber çapında azalma gerçekleşmiştir. Fiber çapının azalması yüzey alanını arttırmaktadır. Ayrıca fiberlerden metronidazol salındıkça PCL molekül zincirleri yeniden düzenlenmektedir. Salınan metronidazol fiber yüzeyinde birikerek yüzeyi pürüzlendirebilir. Bu gibi nedenlerle membran yüzeyi hücre yayılmasını ve çoğalmasını destekliyor olabilir.

HA/Ch/PCL membran üzerinde kültüre edilen MDBK hücrelerine ait 2. ve 8. gün SEM görüntüleri Şekil 4.31 a-d ve Şekil 4.31 e-h'de verilmiştir. HA/Ch/PCL membran ile Ch/PCL membranın MDBK hücreleri ile temas eden yüzeyleri aynıdır. Benzer şekilde bu yüzeyde de 2. günde hücreler yüzeye tutunmuş ama yüzeyde yayılmamışlardır. Ayrıca 8. günde de yüzeyde yayılan hücreye ve hücre dışı matris oluşumuna rastlanmamıştır.

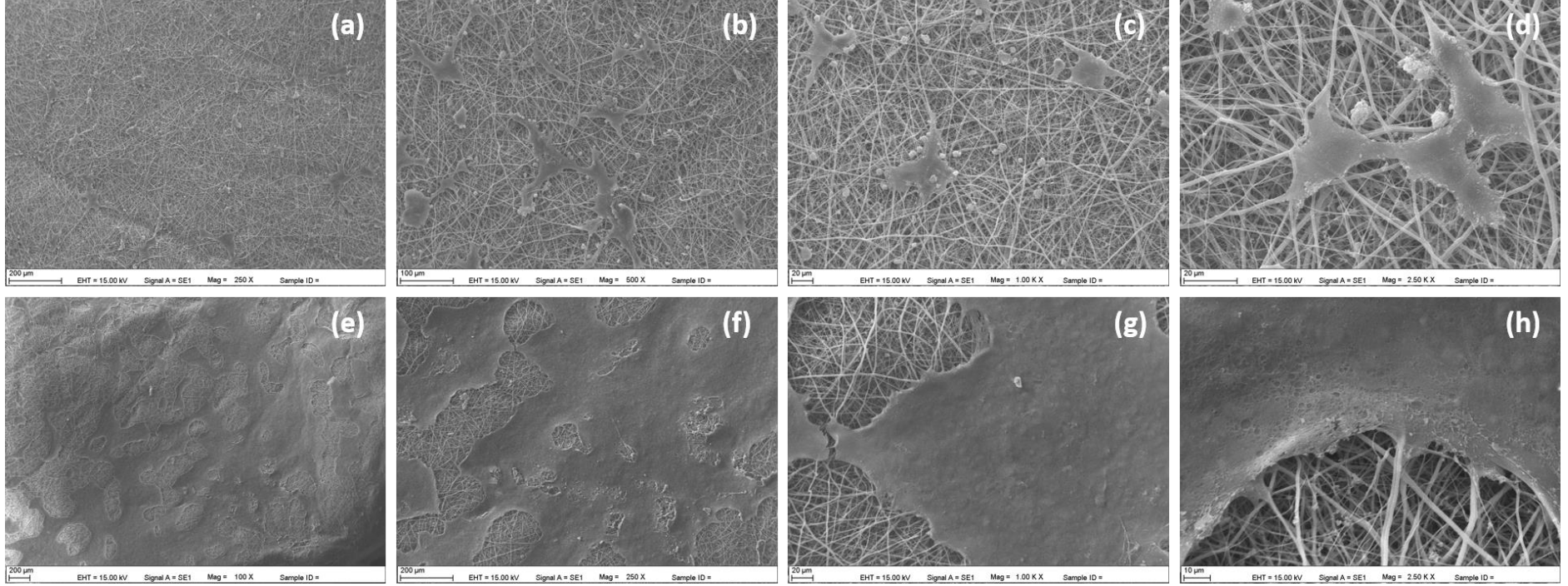
Sonuç olarak tez kapsamında geliştirilen bariyer membranın epitel hücreler ile temas edecek olan metronidazol yüklü PCL fiberler ile kaplı yüzeyi epitel yapıdaki MDBK hücrelerinin yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını desteklemektedir. Membranın bu kısmında önemli olan nokta membran yüzeyinin MDBK hücrelerinin çoğalmasını destekleyip desteklememesinden ziyade MDBK hücrelerinin göçünü engellemesidir. Daha önce de bahsedildiği gibi periodontal rejenerasyonu engelleyen temel etken epitel hücrelerin hasarlı bölgeye göçüdür. Membranın bariyer özelliğinin belirlenmesi amacıyla HA/Ch/PCL membranda kültürün 8. gününde fiber kaplama yüzeyden kaldırılmış ve SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.31 1,j'den görüldüğü gibi fiberin arka kısmında hücreye rastlanmamıştır. Fiberin temas ettiği gözeneksiz membran yüzeyinde (Şekil 4.31 k) ve HA kaplı membran yüzeyinde (Şekil 4.31 l) de hücreye rastlanmamıştır. Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde geliştirilen membranın epitel hücre göçünü engellediği sonucuna varılmıştır.



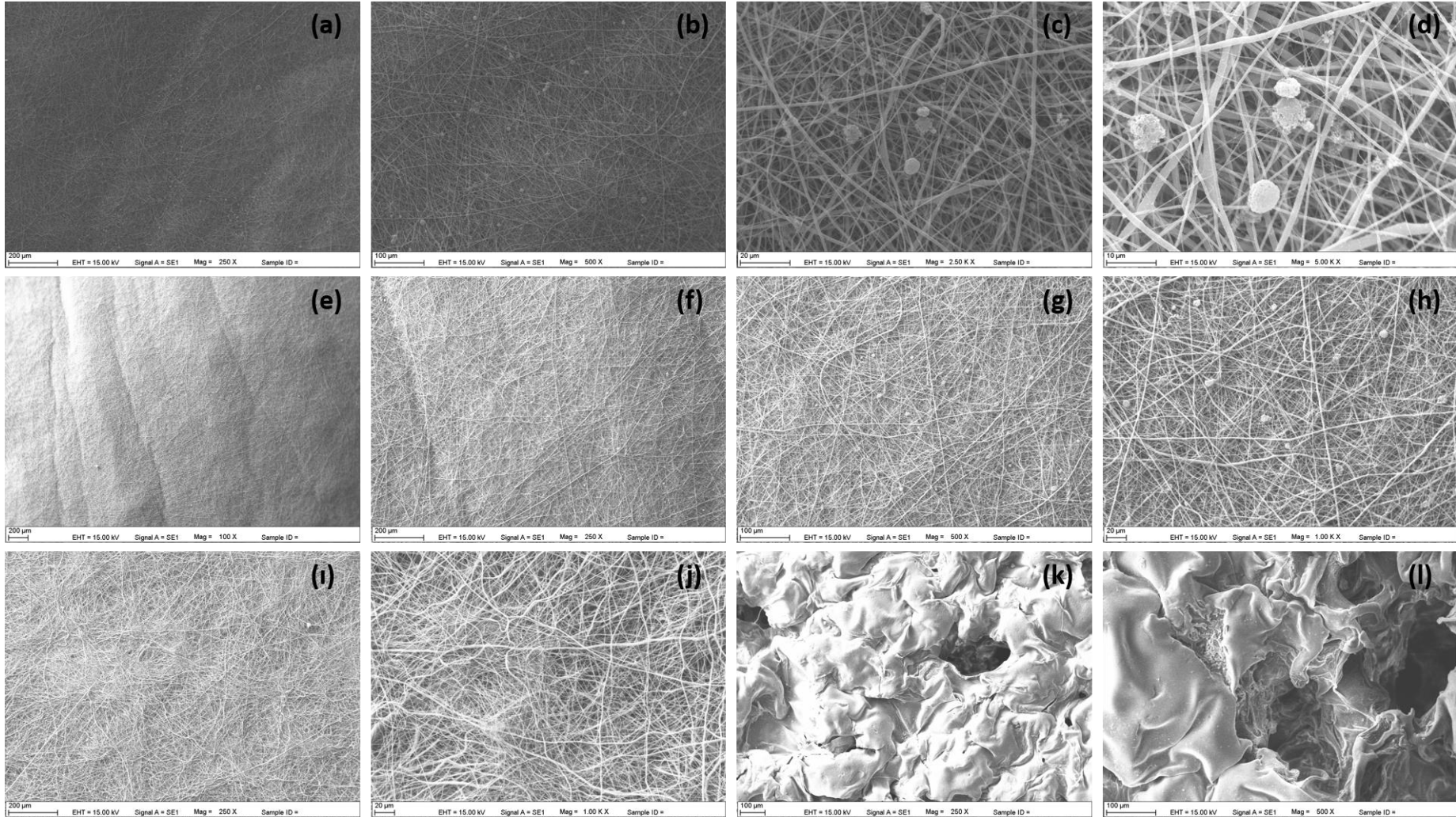
Şekil 4.28. Ch membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 100X; (b) 2. gün, 2,500X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 2. gün, 5,000X; (f) 8. gün, 100X; (g) 8. gün, 250X



Şekil 4.29. Ch/PCL membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 2,500X; (d) 2. gün, 5,000X; (e) 8. gün, 250X; (f) 8. gün, 1,000X; (g) 8. gün, 2,500X; (h) 8. gün, 5,000X



Şekil 4.30. Ch/PCL/Mz membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 1,000X; (d) 2. gün, 2,500X; (e) 8. gün, 100X; (f) 8. gün, 250X; (g) 8. gün, 1,000X; (h) 8. gün, 2,500X



Şekil 4.31. HA/Ch/PCL membran üzerinde çoğalan MDBK hücrelerine ait SEM görüntüleri: (a) 2. gün, 250X; (b) 2. gün, 500X; (c) 2. gün, 2,500X (d) 2. gün, 5,000X; (e) 8. gün, 100X; (f) 8. gün, 250X; (g) 8. gün, 500X; (h) 8. gün, 1,000X; (i) 8. gün, fiber arkası, 250X; (j) 8. gün, fiber arkası, 1,000X; (k) 8. gün, membran gözeneksiz yüzey, 250X; (l) 8. gün, membran gözenekli yüzey, 500X

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında özgün yaklaşımlarla yeni bir bariyer membran geliştirilmiş ve geliştirilen membranın karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra membranın periodontal rejenerasyon amaçlı kullanım potansiyeli farklı hücre hatları ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları ile belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Çalışmanın ilk aşamasında çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile gözenekli kitosan membranlar hazırlanmıştır. Kitosan çözeltilisine gözenek oluşturması amacıyla 4:1 ve 8:1 (ağırlıkça, silika partikülleri:kitosan) olmak üzere farklı oranlarda silika partikülleri eklenmiştir. Silika partiküllerini yapıdan uzaklaştırmak amacıyla membranlar 2, 6, 12 ve 24 saat süresince NaOH ile muamele edilmiş ve 2 saat NaOH ile muamelenin silika partiküllerini uzaklaştırmak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda, membranda yeterli gözeneklilik elde etmek için silika partiküllerinin 8:1 oranında eklenmesine karar verilmiştir.
- ❖ Kitosan membranların yüzey ve kesit morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş ve membranın Petri kabı ile temas eden yüzeyi gözeneksiz yapıda iken, hava ile temas eden yüzeyinin gözenekli yapıda olduğu sonucuna varılmıştır.
- ❖ Homojen gözenek dağılımına sahip, ortalama gözenek boyutu $169.7 \pm 78.7 \mu\text{m}$ olan ve gözenekleri içsel bağlantılı, gliserin muamelesi öncesi ve sonrasında kalınlığı sırasıyla $408.6 \pm 42.2 \mu\text{m}$ ve $519.3 \pm 23.4 \mu\text{m}$ olan kitosan membranlar üretilmiştir.
- ❖ Kitosan membranın sert doku ile temas edecek olan gözenekli yüzeyinin osteoindüktif özelliğini arttırarak kemik doku oluşumunu desteklemesi amacıyla membranın bu yüzeyi grubumuzdan Kaynak G. tarafından optimize edilen koşullarda (600W güç; 30sx9 tekrar) mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak kemik benzeri HA ile kaplanmıştır.
- ❖ Gerçekleştirilen SEM analizi ile membran yüzeyindeki HA kaplamanın varlığı gösterilmiş ve kaplamanın Ca/P oranı yapılan EDX analizi ile 2.54 ± 0.59 olarak bulunmuştur.
- ❖ Membran yüzeyi HA ile kaplandıktan sonra kitosan membran gliserin çözeltilisi ile muamele edilmiş ve böylelikle kitosanın kırılğan doğası giderilerek kolay bir şekilde manipüle edilebilmesi sağlanmıştır.
- ❖ Membranın yumuşak doku ile temas edecek olan gözeneksiz yüzeyi elektroçirme yönteminde faydalanarak 3 ve 7 dk boyunca PCL fiberler ile kaplanmış ve SEM

görüntülerinden membran yüzeyinin 7 dk boyunca PCL fiberler ile kaplanmasına karar verilmiştir.

- ❖ Yumuşak dokudaki iltihabı ortadan kaldırmak amacıyla PCL yapısına ağırlıkça %5, 10 ve 15 oranlarında antibakteriyel bir ajan olan metronidazol eklenmiştir. Metronidazolün PCL fiberlerin yapısına katıldığı SEM görüntüleri ile kanıtlanmış, aynı zamanda PCL fiber çapının metronidazol miktarındaki artışa bağlı olarak azaldığı sonucuna varılmıştır.
- ❖ 37°C'de PBS ortamında bekletilen PCL fiberlerin membran yüzeyinden kalkmadıkları ve Mz salımını gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Elde edilen salım grafiğinden PCL yapısına eklenen metronidazol miktarı arttıkça salınan miktarın da arttığı, %10 ve 15 (ağırlıkça) Mz içeren fiberler ile kaplı membranların 2 saatte, %5 Mz içeren membranların da 6 saatte içerdikleri metronidazolün büyük bir kısmını saldıkları sonucuna varılmıştır.
- ❖ Gözenekli yüzeyi HA, gözeneksiz yüzeyi ise Mz içeren PCL fiberler ile kaplı kitosan membranın kesit görüntüleri SEM ile incelenmiş ve tez kapsamında geliştirilen membranın kalınlığı 750.1 ± 21.9 μm olarak ölçülmüştür.
- ❖ Membranın su içeriğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen şişme testi sonucunda HA/Ch/PCL membranın denge şişmesine ulaşma süresi 1200 s olarak ve şişme oranı ise 3.43 ± 0.13 olarak belirlenmiştir.
- ❖ Ch/PCL ve Ch/PCL/%15 Mz membranların PCL fiberler ile kaplı yüzeylerinde oda sıcaklığında temas açısı ölçümleri yapılmış ve elde edilen temas açısı değerleri sırasıyla; $129.9 \pm 1.43^\circ$ ve $130.4 \pm 1.44^\circ$ olarak ölçülmüştür. Metronidazol ilavesi yüzeyin hidrofobik özelliğini değiştirmemiştir.
- ❖ Kuru ve ıslak haldeki HA/Ch ve HA/Ch/PCL membranlarla gerçekleştirilen çekme testinden elde edilen sonuçlara göre membran yüzeyinin PCL fiberler ile kaplanması hem ıslak hem de kuru halde yapının mekanik dayanımını arttırmıştır. Her iki membranın da kuru haldeki çekme dayanımı ve elastik modül değerleri ıslak haldeki değerlerinden daha yüksektir. HA/Ch membran gerilim-gerinim eğrisinde tek bir deformasyon bölgesine sahipken, HA/Ch/PCL membranın gerilim-gerinim eğrisinde iki tane deformasyon bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir.
- ❖ HA/Ch/PCL membranların biyobozunurlukları lizozim ortamında 28 günlük kültür süresi boyunca takip edilmiş ve membranların ağırlıklarında 28 gün boyunca herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

- ❖ Membranın gözenekli yüzeyinde MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan PrestoBlue ve SEM analizlerinden hücrelerin 4 farklı membran yüzeyinde de tutunup çoğaldığı fakat en yüksek üreme hızını HA/Ch membranda gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca BMP-6 uygulamasının hücre üremesi üzerine etkisi gözlenmezken, hücreler tarafından sentezlenen hücre dışı matris miktarını arttırdığı sonucuna varılmıştır.
- ❖ Membran yüzeylerine tutunan hücrelerde ALP enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ALP boyama yapılmıştır. Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde ALP enzim aktivitesinin 7. günde tüm gruplarda 14. ve 21. günlere kıyasla daha yüksek olduğu, ayrıca 7. günde ALP enzim aktivitesinin HA/Ch, HA/BMP-6/Ch ve HA/Ch/PCL membranlarda, Ch membrana göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.
- ❖ Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla kollajen I (KOL I), RunX2, osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) için RT-PCR analizi yapılmıştır. KOL I gen ifadesi 14. günde HA/BMP-6/Ch grupta Ch membrana göre daha yüksek bulunmuştur. Osteoblast farklılaşmasında önemli bir düzenleyici ve erken farklılaşmanın diğer bir belirteci olan RunX2 ekspresyonu 14. günde HA/Ch, HA/Ch/PCL gruplarda özellikle de HA/BMP-6/Ch grubunda Ch membrana göre daha yüksek bulunmuştur. Her iki gen ifadesinde de HA/BMP-6/Ch grubu ile HA/Ch ve HA/Ch/PCL grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Geç osteoblastik farklılaşmanın belirteci olan OCN ifadesi incelendiğinde 21. günde en yüksek OCN ekspresyonuna BMP-6'lı grupta ulaşılmıştır.
Farklılaşmanın son basamağında ortaya çıkan osteopontin seviyeleri incelendiğinde 21. günde en yüksek OPN seviyesi HA/Ch/BMP-6 membrana aittir.
- ❖ Membranın gözeneksiz yüzeyinde MDBK hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan SEM analizlerinden hücrelerin sadece Ch/PCL/Mz membranda yayılıp çoğaldıkları gözlemlenmiştir. Ayrıca geliştirilen membranın epitel hücre göçünü engellediği sonucuna varılmıştır. PrestoBlue grafiği incelendiğinde ise, hücrelerin Ch ve Ch/PCL/Mz membranlar üzerindeki üreme hızının Ch/PCL ve HA/Ch/PCL membranlar üzerindeki üreme hızından yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan alışmalar sonucunda kitosanın yetersiz biyoaktivitesi osteoindüktif hidroksiapatit moleküllerinin membran yüzeyine kaplanmasıyla ve BMP-6 moleküllerinin HA kaplı membran yüzeyine adsorplanmasıyla iyileştirilmiş ve membranın bu yüzeyinin MC3T3-E1 preosteoblastik hücrelerinin yapışmasını, yayılmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve ekstraselüler matris mineralizasyonunu desteklediği belirlenmiştir. Membranın PCL fiberler ile kaplı yüzeyinin epitel hücre göçünü engellediği ve metronidazol salımını gerçekleştirerek yumuşak dokudaki iltihap etkisini ortadan kaldırabileceği belirlenmiştir. Kitosanın kırılınan doğası uygun bileşim ve koşullardaki gliserin muamelesi ile giderilerek kolaylıkla manipüle edilebilen şekil hafızalı bir bariyer membran üretilmiştir. Sonuç olarak tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarla; biyobozunur, şekil hafızalı, osteojenik aktiviteye sahip, kemik rejenerasyonunu destekleyen, epitel hücre göçünü engelleyen ve inflamasyonu ortadan kaldırabilecek, kolaylıkla ve ucuza üretilebilen bir bariyer membran geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Soran, Z., Aydın, R.S., Gümüşderelioğlu, M., Chitosan scaffolds with BMP-6 loaded alginate microspheres for periodontal tissue engineering, *Journal of Microencapsulation*, 29, 8, 770-780, **2012**.
- [2] Mota, J., Yu, N., Caridade, S.G., Luz, G.M., Gomes, M.E., Reis, R.L., Jansen, J.A., Walboomers, X.F., Mano, J.F., Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration, *Acta Biomaterialia*, 8, 4173–4180, **2012**.
- [3] Bottino, M.C., Thomas, V., Schmidt, G., Vohra, Y.K., Chu, T.M.G., Kowolik, M.J., Janowski, G.M., Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective, *Dental Materials*, 28, 703-721, **2012**.
- [4] Villar, C.C., Cochran, D.L., Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration, *Dental Clinics of North America*, 54, 73–92, **2010**.
- [5] Benatti, B.B., Silvério, K.G., Casati, M.Z., Sallum, E.A., Nociti, F.H.Jr., Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 1–6, **2007**.
- [6] Oh, S.H., Kim, J.H., Kim, J.M., Lee, J.H., Asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 membrane for effective guided bone regeneration, *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 17, 1375–1387, **2006**.
- [7] Teng, S.H., Lee, E.J., Wang, P., Shin, D.S., Kim, H.E., Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 87B, 132-138, **2008**.
- [8] Hurt, A.P., Getti, G., Coleman, N.J., Bioactivity and biocompatibility of a chitosan-tobermorite composite membrane for guided tissue regeneration, *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 11– 16, **2014**.
- [9] Lan, S.F., Kehinde, T., Zhang, X., Khajotia, S., Schmidtke, D.W., Starly, B., Controlled release of metronidazole from composite poly-ε-caprolactone/alginate (PCL/alginate) rings for dental implants, *Dental Materials*, 29, 656-665, **2013**.
- [10] Bendesky, A., Menéndez, D., Ostrosky-Wegman, P., Is metronidazole carcinogenic?, *Mutation Research*, 511, 133–144, **2002**.
- [11] Löfmark, S., Edlund, C., Nord, C.E., Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections, *Clinical Infectious Diseases*, 50, 16-23, **2010**.

- [12] Sell, S., Barnes, C., Smith, M., McClure, M., Madurantakam, P., Grant, J., McManus, M., Bowlin, G., Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers, *Polymer International*, 56, 1349–1360, **2007**.
- [13] Valarezo, E., Tammaro, L., González, S., Malagón, O., Vittoria, V., Fabrication and sustained release properties of poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers loaded with layered double hydroxide nanoparticles intercalated with amoxicillin, *Applied Clay Science*, 72, 104–109, **2013**.
- [14] Hughes, F.J., Ghuman, M., Talal, A., Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer?, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224, 1345-1358, **2010**.
- [15] Antiabong, J.F., Boardman, W., Moore, R.B., Brown, M.H., Ball, A.S., The oral microbial community of gingivitis and lumpy jaw in captive Macropods, *Research in Veterinary Science*, 95, 996–1005, **2013**.
- [16] Sowmya, S., Bumgardener, J.D., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Jayakumar, R., Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration, *Progress in Polymer Science*, 38, 1748– 1772, **2013**.
- [17] Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., Periodontal diseases, *Lancet*, 366, 1809–1820, **2005**.
- [18] Nishimura, F., Iwamoto, Y., Soga, Y., The periodontal host response with diabetes, *Periodontology 2000*, 43, 245–253, **2007**.
- [19] Nanci, A., Bosshardt, D.D., Structure of periodontal tissues in health and disease, *Periodontology 2000*, 40, 11–28, **2006**.
- [20] Huang, S., Lu, F., Li, J., Lan, T., Huang, B., Yin, X., Jin, H., Quantification of tryptase-TIM-3 double-positive mast cells in human chronic periodontitis, *Archives of Oral Biology*, 59 654-661, **2014**.
- [21] Şener, N., *Kronik ve agresif periodontitis hastalarının cerrahisiz periodontal tedavi sonrası kısa dönemde iyileşmelerinin klinik değerlendirmesi*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2004**.
- [22] Özdemir, H., Marakoğlu, İ., Periodontopatojenler, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 7, 52-59, **2004**.
- [23] The American Academy of Periodontology, Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support, *Journal of Periodontology*, 71, 853-855, **2000**.
- [24] Walchuck, R.E., *Periodontitis symptoms, treatment and prevention*, Nova Science Publishers, Inc, New York, **2010**.

- [25] Lindhe, J., Karring, T., Lang, N.P., *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th Edition, Blackwell Munksgaard Publishing Company, UK, 433-448, **2003**.
- [26] Nevins, M., Mellonig, J.T., *Periodontal Therapy Clinical Approaches and Evidence of Success Volume 1*, Quintessence Publishing Co, Inc, **1998**.
- [27] Nield-Gehrig, J.S., *Fundamentals of periodontal instrumentation and advanced root instrumentation*, Seventh Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore & Philadelphia, 285-306, **2008**.
- [28] Ağzı, O., *Periodontitisli hastalarda doğal dişi mi korumalıyız ya da dişi çekip implant mı uygulamalıyız?*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2012**.
- [29] Sherman, P.R., Hutchens, L.H.Jr., Jewson, L.G., Moriarty, J.M., Greco, G.W., McFall, W.T.Jr., The effectiveness of subgingival scaling and root planing I. Clinical detection of residual calculus, *Journal of Periodontology*, 61, 3-8, **1990**.
- [30] Sav, Ö., *Ultrasonikler ile el aletlerinin kök yüzeyi düzleştirilmesi açısından karşılaştırılması*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2008**.
- [31] Cohen, R.E., Mariotti, A., Rethman, M., Zackin, S.J., *Glossary of periodontal terms*, 4th Edition, Chicago, The American Academy of Periodontics, **2001**.
- [32] Stambaugh, R.V., Drago, M., Smith, D.M., Carasali, L., The limits of subgingival scaling, *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 1, 30-41, **1981**.
- [33] Antczak-Bouckoms, A., Joshipura, K., Burdick, E., Tulloch, J.F., Meta-analysis of surgical versus non-surgical methods of treatment for periodontal disease, *Journal of Clinical Periodontology*, 20, 259-268, **1995**.
- [34] Greenstein, G., Contemporary interpretation of probing depth assessments: diagnostic and therapeutic implications. A literature review, *Journal of Periodontology*, 68, 1194-1205, **1997**.
- [35] Barrington, E.P., An overview of periodontal surgical procedures, *Journal of Periodontology*, 52, 518-528, **1981**.
- [36] Telatar, C., *Periodontal desteği azalmış dişlerin tedavisinde genel yaklaşımlar*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2008**.
- [37] Gorrel, C.E., Hale, F.A., *Oral and Maxillofacial Surgery in Dogs and Cats*, Chapter 18: Gingivectomy and gingivoplasty, **2012**.

- [38] Gorrel, C.E., Hale, F.A., *Oral and Maxillofacial Surgery in Dogs and Cats*, Chapter 17: Principles of periodontal surgery, **2012**.
- [39] Lee, J., Stavropoulos, A., Susin, C., Wikesjö, U.M.E., Periodontal regeneration: focus on growth and differentiation factors, *Dental Clinics of North America*, 54, 93–111, **2010**.
- [40] Keklik, H., *Rejeneratif periodontal tedavide kullanılan greft materyalleri*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2010**.
- [41] Shimauchi, H., Nemoto, E., Ishihata, H., Shimomura, M., Possible functional scaffolds for periodontal regeneration, *Japanese Dental Science Review*, 49, 118-130, **2013**.
- [42] Srinivasan, S., Jayasree, R., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Jayakumar, R., Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 87, 274–283, **2012**.
- [43] Ramseier, C.A., Rasperini, G., Batia, S., Giannobile, W.V., Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair, *Periodontology 2000*, 59, 185–202, **2012**.
- [44] Reynolds, M.A., Aichelmann-Reidy, M.E., Branch-Mays, G.L., Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts, *Dental Clinics of North America*, 54, 55–71, **2010**.
- [45] Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., Petite, H., Engineering bone: challenges and obstacles, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 72–84, **2005**.
- [46] Rastogi, P., Saini, H., Singhal, R., Dixit, J., Periodontal regeneration in deep intrabony periodontal defect using hydroxyapatite particles with platelet rich fibrin membrane-a case report, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 1, 41–43, **2011**.
- [47] Bakır, M., *Çeneler ve yüz bölgesinde kullanılan greft materyalleri*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir, **2013**.
- [48] Bashutski, J.D., Wang, H.L., Periodontal and endodontic regeneration, *Journal of Endodontics*, 35, 321–328, **2009**.
- [49] Bhatt, R.A., Rozental, T.D., Bone graft substitutes, *Hand Clinics*, 28, 457–468, **2012**.
- [50] Holtzclaw, D., Toscano, N., Eisenlohr, L., Callan, D., The safety of bone allografts used in dentistry: a Review, *The Journal of the American Dental Association*, 139, 1192-1199, **2008**.

- [51] Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone Tissue Engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743–765, **2004**.
- [52] Auer, J.A., von Rechenberg, B., Bohner, M., Hofmann-Antenbrink, M., *Equine Surgery*, Fourth Edition Chapter 77: Bone Grafts and Bone Replacements, **2012**.
- [53] The committee on research, science and therapy of the American academy of periodontology, Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration, *Journal of Periodontology*, 72, 834–838, **2001**.
- [54] Tang, T.T., Lu, H., Dai, K.R., Osteogenesis of freeze-dried cancellous bone allograft loaded with autologous marrow-derived mesenchymal cells, *Materials Science and Engineering: C*, 20, 57–61, **2002**.
- [55] Bielecki, T., Cieslik-Bielecka, A., Zelawski, M., Mikusek, W., A side-effect induced by the combination of a demineralized freeze-dried bone allograft and leucocyte and platelet-rich plasma during treatment for large bone cysts: a 4-year follow-up clinical study, *Transfusion and Apheresis Science*, 47, 133–138, **2012**.
- [56] Gentile, P., Chiono, V., Tonda-Turo, C., Ferreira, A.M., Ciardelli, G., Polymeric membranes for guided bone regeneration, *Biotechnology Journal*, 6, 1187–1197, **2011**.
- [57] Bottino, M.C., Thomas, V., Janowski, G.M., A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration, *Acta Biomaterialia*, 7, 216–224, **2011**.
- [58] Rakhmatia, Y.D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A., Koyano, K., Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications, *Journal of Prosthodontic Research*, 57, 3–14, **2013**.
- [59] Liao, S., Wang, W., Uo, M., Ohkawa, S., Akasaka, T., Tamura, K., Cui, F., Watari, F., A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration, *Biomaterials*, 26, 7564–7571, **2005**.
- [60] Carbonell, J.M., Martín, I.S., Santos, A., Pujol, A., Sanz-Moliner, J.D., Nart, J., High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43, 75–84, **2014**.
- [61] Polimeni, G., Koo, K.T., Qahash, M., Xiropaidis, A.V., Albandar, J.M., Wikesjö, U.M.E., Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of a space-providing biomaterial on guided tissue regeneration, *Journal of Clinical Periodontology*, 31, 725–729, **2004**.

- [62] Hong, H., Wei, J., Liu, C., Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration, *Composites Part B: Engineering*, 38, 311–316, **2007**.
- [63] Kikuchi, M., Koyama, Y., Yamada, T., Imamura, Y., Okada, T., Shirahama, N., Akita, K., Takakuda, K., Tanaka, J., Development of guided bone regeneration membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly(l-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) composites, *Biomaterials*, 25, 5979–5986, **2004**.
- [64] Chen, Y., Mak, A.F.T., Wang, M., Li, J.S., Wong, M.S., In vitro behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2261–2268, **2008**.
- [65] Behring, J., Junker, R., Walboomers, X. F., Chessnut, B., Jansen, J.A., Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review, *Odontology*, 96, 1–11, **2008**.
- [66] Gunatillake, P., Mayadunne, R., Adhikari, R., Recent developments in biodegradable synthetic polymers, *Biotechnology Annual Review*, 12, 301–347, **2006**.
- [67] Shi, R., Xue, J., He, M., Chen, D., Zhang, L., Tian, W., Structure, physical properties, biocompatibility and in vitro/vivo degradation behavior of anti-infective polycaprolactone-based electrospun membranes for guided tissue/bone regeneration, *Polymer Degradation and Stability*, 109, 293–306, **2014**.
- [68] Kim, S.Y., Kanamori, T., Noumi, Y., Wang, P.C., Shinbo, T., Preparation of porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) membranes by a phase inversion process and investigation of their morphological changes as cell culture scaffolds, *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 2082–2092, **2004**.
- [69] Liao, S., Watari, F., Zhu, Y., Uo, M., Akasaka, T., Wang, W., Xu, G., Cui, F., The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro, *Dental Materials*, 23, 1120–1128, **2007**.
- [70] Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*, 35, 1217–1256, **2010**.
- [71] Gautam, S., Dinda, A.K., Mishra, N.C., Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method, *Materials Science and Engineering: C*, 33, 1228–1235, **2013**.

- [72] Zheng, R., Duan, H., Xue, J., Liu, Y., Feng, B., Zhao, S., Zhu, Y., Liu, Y., He, A., Zhang, W., Liu, W., Cao, Y., Zhou, G., The influence of gelatin/PCL ratio and 3-D construct shape of electrospun membranes on cartilage regeneration, *Biomaterials*, 35, 152-164, **2014**.
- [73] Xue, J., He, M., Liu, H., Niu, Y., Crawford, A., Coates, P.D., Chen, D., Shi, R., Zhang, L., Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes, *Biomaterials*, 35, 9395-9405, **2014**.
- [74] Shin, S.Y., Park, H.N., Kim, K.H., Lee, M.H., Choi, Y.S., Park, Y.J., Lee, Y.M., Ku, Y., Rhyu, I.C., Han, S.B., Lee, S.J., Chung, C.P., Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration, *Journal of Periodontology*, 76, 1778-1784, **2005**.
- [75] Ho, M.H., Hsieh, C.C., Hsiao, S.W., Van Hong Thien, D., Fabrication of asymmetric chitosan GTR membranes for the treatment of periodontal disease, *Carbohydrate Polymers*, 79, 955–963, **2010**.
- [76] Tai, H.Y., Fu, E., Don, T.M., Calcium phosphates synthesized by reverse emulsion method for the preparation of chitosan composite membranes, *Carbohydrate Polymers*, 88, 904– 911, **2012**.
- [77] Farzadi, A., Solati-Hashjin, M., Bakhshi, F., Aminian, A., Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation, *Ceramics International*, 37, 65–71, **2011**.
- [78] Aday, S., Gümüşderelioglu, M., Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 1418–1426, **2010**.
- [79] Caridade, S.G., Merino, E.G., Alves, N.M., Mano, J.F., Bioactivity and viscoelastic characterization of chitosan/bioglass[®] composite membranes, *Macromolecular Bioscience*, 12, 1106–1113, **2012**.
- [80] Yang, F., Both, S.K., Yang, X., Walboomers, X. F., Jansen, J.A., Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application, *Acta Biomaterialia*, 5, 3295–3304, **2009**.
- [81] Pattnaik, S., Nethala, S., Tripathi, A., Saravanan, S., Moorthi, A., Selvamurugan, N., Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 1167– 1172, **2011**.
- [82] Kavya, K.C., Jayakumar, R., Nair, S., Chennazhi, K.P., Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 255–263, **2013**.

- [83] Zhang, Y., Zhang, M., Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 304–312, **2001**.
- [84] Bellucci, D., Sola, A., Cannillo, V., A Revised Replication Method for Bioceramic Scaffolds, *Bioceramics Development and Applications*, 1, 1-8, **2011**.
- [85] Sendemir-Urkmez, A., Jamison, R.D., The addition of biphasic calcium phosphate to porous chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A, 624–633, **2007**.
- [86] Rouahi, M., Gallet, O., Champion, E., Dentzer, J., Hardouin, P., Anselme, K., Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 78A, 222–235, **2006**.
- [87] Li, X., Nan, K., Shi, S., Chen, H., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane intended for tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 43–49, **2012**.
- [88] Murugan, R., Ramakrishna, S., Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, 65, 2385–2406, **2005**.
- [89] Xianmiao, C., Yubao, L., Yi, Z., Li, Z., Jidong, Li., Huanan, W., Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, *Materials Science and Engineering: C*, 29, 29–35, **2009**.
- [90] Madhumathi, K., Shalumon, K.T., Rani, V.V.D, Tamura, H., Furuike, T., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Jayakumar, R., Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 12–15, **2009**.
- [91] Tunçay, Ö.E., *Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, **2013**.
- [92] Kaynak, G., *Mikrodalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-HA doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, **2012**.
- [93] Nayak, A.K., Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview, *International Journal of ChemTech Research*, 2, 903-907, **2010**.

- [94] Lee, B.T., Youn, M.H., Paul, R.K., Lee, K.H., Song, H.Y., In situ synthesis of spherical BCP nanopowders by microwave assisted process, *Materials Chemistry and Physics*, 104, 249–253, **2007**.
- [95] Nazir, R., Iqbal, N., Khan, A.S., Akram, A., Asif, A., Chaudhry, A.A., ur. Rehman, I., Hussain, R., Rapid synthesis of thermally stable hydroxyapatite, *Ceramics International*, 38, 457–462, **2012**.
- [96] Kokubo, T., Hanakawa, M., Kawashita, M., Minoda, M., Beppu, T., Miyamoto, T., Nakamura, T., Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF, *Biomaterials*, 25, 4485–4488, **2004**.
- [97] Jalota, S., Bhaduri, S.B., Tas, A.C., Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 697–707, **2006**.
- [98] Barrere, F., van Blitterswijk, C.A., de Groot, K., Layrolle, P., Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution, *Biomaterials*, 23, 1921–1930, **2002**.
- [99] Mavis, B., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 3098–3111, **2009**.
- [100] Gümüşderelioğlu, M., Kaynak, G., Mikrodalgalar ve uygulamaları, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Tübitak, Temmuz, **2012**.
- [101] Thostenson, E.T., Chou, T.W., Microwave processing: fundamentals and applications, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 30, 1055–1071, **1999**.
- [102] Costa, C., Santos, A.F., Fortuny, M., Araújo, P.H.H., Sayer, C., Kinetic advantages of using microwaves in the emulsion polymerization of MMA, *Materials Science and Engineering C*, 29, 415–419, **2009**.
- [103] Shen, X., Zhai, Y., Sun, Y., Gu, H., Preparation of monodisperse spherical SiO₂ by microwave hydrothermal method and kinetics of dehydrated hydroxyl, *Journal of Materials Science & Technology*, 26, 711-714, **2010**.
- [104] Kumar, T.S.S., Manjubala, I., Gunasekaran, J., Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation, *Biomaterials*, 21, 1623-1629, **2000**.
- [105] Han, J.K., Song, H.Y., Saito, F., Lee, B.T., Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method, *Materials Chemistry and Physics*, 99, 235–239, **2006**.
- [106] Cao, J.M., Feng, J., Deng, S.G., Chang, X., Wang, J., Liu, J.S., Lu, P., Lu, H.X., Zheng, M.B., Zhang, F., Tao, J., Microwave-assisted solid-state synthesis of

- hydroxyapatite nanorods at room temperature, *Journal of Materials Science*, 40, 6311–6313, **2005**.
- [107] Stamatialis, D.F., Papenburg, B.J., Girones, M., Saiful, S., Bettahalli, S.N.M., Schmitmeier, S., Wessling, M., Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering, *Journal of Membrane Science*, 308, 1–34, **2008**.
- [108] Reneker, D.H., Yarin, A.L., Electrospinning jets and polymer nanofibers, *Polymer*, 49, 2387-2425, **2008**.
- [109] Sill, T.J., von Recum, H.A., Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 1989-2006, **2008**.
- [110] Sell, S.A., McClure, M.J., Garg, K., Wolfe, P.S., Bowlin, G.L., Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1007–1019, **2009**.
- [111] Agarwal, S., Greiner, A., Wendorff, J.H., Electrospinning of manmade and biopolymer nanofibers—progress in techniques, materials, and applications, *Advanced Functional Materials*, 19, 2863-2879, **2009**.
- [112] Martins, A., Reis, R.L., Neves, N.M., Electrospinning: processing technique for tissue engineering scaffolding, *International Materials Reviews*, 53, 257-274, **2008**.
- [113] Heitz-Mayfield, L.J.A, Systemic antibiotics in periodontal therapy, *Australian Dental Journal*, 54, 96–101, **2009**.
- [114] Sarı, E., *Periodontal Hastalıklarda Sistemik Antibiyotik Kullanımı*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2012**.
- [115] Bozacı, M., *Periodontal hastalıklarda tedavi ve profilaksi amaçlı sistemik antibiyotik kullanımı*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2010**.
- [116] Kulik Kunz, E.M., Lenkeit, K., Waltimo, T., Weiger, R., Walter, C., Combinatorial effects of amoxicillin and metronidazole on selected periodontal bacteria and whole plaque samples, *Archives of Oral Biology*, 59, 608-615, **2014**.
- [117] Sindhura Reddy, N., Sowmya, S., Bumgardner, J.D., Chennazhi, K.P., Biswas, R., Jayakumar, R., Tetracycline nanoparticles loaded calcium sulfate composite beads for periodontal management, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 2080–2090, **2014**.
- [118] Divya, P.V., Nandakumar, K., Local drug delivery – periocol in periodontics, *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 19, 74–80, **2006**.

- [119] Vyas, S. P., Sihorkar, V., Mishra, V., Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 25, 21-42, **2000**.
- [120] Javed, F., Al-Askar, M., Al-Rasheed, A., Al-Hezaimi, K., Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration, *Archives of Oral Biology*, 56, 1476-1484, **2011**.
- [121] Zhang, Y., Cheng, X., Wang, J., Wang, Y., Shi, B., Huang, C., Yang, X., Liu, T., Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor- β 1 DNA for periodontal tissue engineering, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344, 362–369, **2006**.
- [122] Tatakis, D.N., Wikesjö, U.M.E., Razi, S.S., Sigurdsson, T.J., Lee, M.B., Nguyen, T., Ongpipattanakul, B., Hardwick, R., Periodontal repair in dogs: effect of transforming growth factor- β 1 on alveolar bone and cementum regeneration, *Journal of Clinical Periodontology*, 27, 698–704, **2000**.
- [123] Lütfoğlu, M., Periodontal rejenerasyon ve büyüme faktörleri, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 17, 35-43, **2007**.
- [124] Chen, F.M., Zhao, Y.M., Wu, H., Deng, Z.H., Wang, Q.T., Zhou, W., Liu, Q., Dong, G.Y., Li, K., Wu, Z.F., Jin, Y., Enhancement of periodontal tissue regeneration by locally controlled delivery of insulin-like growth factor-I from dextran–co-gelatin microspheres, *Journal of Controlled Release*, 114, 209–222, **2006**.
- [125] Murakami, S., Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy?, *Periodontology 2000*, 56,188-208, **2011**.
- [126] Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., Arai, T., Nakagawa, T., Ito, K., Oda, S., Izumi, Y., Ogata, Y., Yamada, S., Shimauchi, H., Kunimatsu, K., Kawanami, M., Fujii, T., Furuichi, Y., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Omae, M., Yamada, S., Watanuki, M., Murakami, S., FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial, *Journal of Dental Research*, 90, 35-40, **2011**.
- [127] Marie, P.J., Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation, *Gene*, 316, 23–32, **2003**.
- [128] Wildemann, B., Kandziora, F., Krummrey, G., Palasdiess, N., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G., Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle, *Journal of Controlled Release*, 95, 249–256, **2004**.

- [129] Park, Y.J., Lee, Y.M., Park, S.N., Sheen, S.Y., Chung, C.P., Lee, S. J., Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration, *Biomaterials*, 21 153-159, **2000**.
- [130] Jeon, O., Song, S.J., Yang, H.S., Bhang, S.H., Kang, S.W., Sung, M.A., Lee, J.H., Kim, B.S., Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369, 774–780, **2008**.
- [131] Yilgor, P., Tuzlakoglu, K., Reis, R.L., Hasirci, N., Hasirci, V., Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 3551–3559, **2009**.
- [132] Huang, K.K., Shen, C., Chiang, C.Y., Hsieh, Y.D., Fu, E., Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in a fenestration defect of rats, *Journal of Periodontal Research*, 40, 1–10, **2005**.
- [133] Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioǧlu, M., Nohutcu, R.M., Bone morphogenetic protein-6-loaded chitosan scaffolds enhance the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells, *Artificial Organs*, 34, 65-74, **2010**.
- [134] Okuda, K., Momose, M., Miyazaki, A., Murata, M., Yokoyama, S., Yonezawa, Y., Wolff, L.F., Yoshie, H., Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. *Journal of Periodontology*, 71, 1821-1828, **2000**.
- [135] Venezia, E., Goldstein, M., Boyan, B.D., Schwartz, Z., The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15, 382-402, **2004**.
- [136] Esposito, M., Grusovin, M.G., Papanikolaou, N., Coulthard, P., Worthington, H.V., Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2009**.
- [137] Lossdörfer, S., Sun, M., Götz, W., Dard, M., Jäger, A., Enamel matrix derivative promotes human periodontal ligament cell differentiation and osteoprotegerin production in vitro, *Journal of Dental Research*, 86, 980-985, **2007**.
- [138] Grover, V., Malhotra, R., Kapoor, A., Verma, N., Sahota, J.K., Future of Periodontal Regeneration, *Journal of Oral Health & Community Dentistry*, 4, 38-47, **2010**.
- [139] Ramseier, C.A., Abramson, Z.R., Jin, Q., Giannobile, W.V., Gene Therapeutics for Periodontal Regenerative Medicine, *Dental Clinics of North America*, 50, 245–263, **2006**.

- [140] Zhang, Y., Wang, Y., Shi, B., Cheng, X., A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering, *Biomaterials*, 28, 1515–1522, **2007**.
- [141] Intini, G., Future Approaches in Periodontal Regeneration: Gene Therapy, Stem Cells, and RNA Interference, *Dental Clinics of North America*, 54, 141–155, **2010**.
- [142] Takedachi, M., Sawada, K., Yamamoto, S., Ozasa, M., Shimabukuro, Y., Kitamura, M., Murakami, S., Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived stem cells, *Journal of Oral Biosciences*, 55, 137–142, **2013**.
- [143] Chen, F.M., Sun, H.H., Lu, H., Yu, Q., Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration, *Biomaterials*, 33, 6320-6344, **2012**.
- [144] Yang, Y., Rossi, F.M., Putnins, E.E., Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells, *Biomaterials*, 31, 8574-8582, **2010**.
- [145] Gümüşderelioğlu, M., Agi, P., Adsorption of concanavalin A on the well-characterized macroporous chitosan and chitin membranes, *Reactive & Functional Polymers*, 61, 211–220, **2004**.
- [146] Han, F., Dong, Y., Su, Z., Yin, R., Song, A., Sanming, L., Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material, *International Journal of Pharmaceutics*, 476, 124–133, **2014**.
- [147] Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., Du, Y., Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity, *Carbohydrate Polymers*, 63, 367–374, **2006**.
- [148] Zeng, X., Ruckenstein, E., Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation, *Biotechnology Progress*, 15, 1003-1019, **1999**.
- [149] Gerçek, I., Tıǧlı, R. S., Gümüşderelioğlu, M., A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A, 1012–1022, **2008**.
- [150] El Kady, A.M., Mohamed, K.R., El-Bassyouni, G.T., Fabrication, characterization and bioactivity evaluation of calcium pyrophosphate/polymeric biocomposites, *Ceramics International*, 35, 2933–2942, **2009**.
- [151] Tuzlakoglu, K., Reis, R.L., Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1279–1286, **2007**.

- [152] Li, B., Huang, L., Wang, X., Ma, J., Xie, Fang., Biodegradation and compressive strength of phosphorylated chitosan/chitosan/hydroxyapatite bio-composites, *Materials and Design*, 32, 4543–4547, **2011**.
- [153] Baskar, D., Balu, R., Kumar, T.S.S., Mineralization of pristine chitosan film through biomimetic process, *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 385–389, **2011**.
- [154] Jongwattanapisan, P., Charoenphandhu, N., Krishnamra, N., Thongbunchoo, J., Tang, I.M., Hoonsawat, R., Smith, S. M., Pon-On, W., In vitro study of the SBF and osteoblast-like cells on hydroxyapatite/chitosan–silica nanocomposite, *Materials Science and Engineering C*, 31, 290–299, **2011**.
- [155] Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1–23, **2004**.
- [156] Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J., Jannesari, M., Controlled release of metronidazole benzoate from poly- ϵ -caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, 179–185, **2010**.
- [157] Zeng, J., Yang, L., Liang, Q., Zhang, X., Guan, H., Xu, X., Chen, X., Jing, X., Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation, *Journal of Controlled Release*, 105, 43–51, **2005**.
- [158] Zeng, J., Xu, X., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., Jing, X., Biodegradable electrospun fibers for drug delivery, *Journal of the Controlled Release*, 92, 227–231, **2003**.
- [159] Xu, X., Yang, L., Xu, X., Wang, X., Chen, X., Liang, Q., Zeng, J., Ling, X., Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions, *Journal of the Controlled Release*, 108, 33–42, **2005**.
- [160] Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J., Dijck, A.V., Mensch, J., Noppe, M., Brewster, M.E., Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer, *Journal of the Controlled Release*, 92, 349–360, **2003**.
- [161] Kim, K., Luu, Y.K., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B.S., Chu, B., Hadjiargyrou, M., Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds, *Journal of the Controlled Release*, 98, 47–56, **2004**.
- [162] Kenawy, El.R., Bowlin, G.L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D.G., Sanders, E.H., Wnek, G.E., Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend, *Journal of the Controlled Release*, 81, 57–64, **2002**.

- [163] Reise, M., Wyrwa, R., Müller, U., Zylinski, M., Völpel, A., Schnabelrauch, M., Berg, A., Jandt, K.D., Watts, D.C., Sigusch, B.W., Release of metronidazole from electrospun poly(l-lactide-co-d/l-lactide) fibers for local periodontitis treatment, *Dental Materials*, 28, 179-188, **2012**.
- [164] Chen, T., Chen, L., Li, H., Chen, Y., Guo, H., Shu, Y., Chen, Z., Cai, C., Guo, L., Zhang, X., Zhou, L., Zhong, Q., Design and in vitro evaluation of a novel poly(methacrylicacid)/metronidazole antibacterial nanogel as an oral dosage form, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118, 65–71, **2014**.
- [165] El-Newehy, M.H., Al-Deyab, S.S., Kenawy, El-R., Abdel-Megeed, A., Fabrication of electrospun antimicrobial nanofibers containing metronidazole using nanospider technology, *Fibers and Polymers*, 13, 709-717, **2012**.
- [166] de Souza Ferreira, S.B., de Assis Dias, B.Rafael., Obregon, C.S., Gomes, C.C., de Araujo, Pereira R.R., Ribeiro Godoy, J.S., Estivalet Svidzinski, T.I., Bruschi, M.L., Microparticles containing propolis and metronidazole: in vitro characterization, release study and antimicrobial activity against periodontal pathogens, *Pharmaceutical Development and Technology*, 19, 173–180, **2014**.
- [167] Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Weiger, R., Walter, C., Zitzmann, N.U., Walimo, T., Microcalorimetric determination of the effects of amoxicillin, metronidazole, and their combination on in vitro biofilm, *Journal of periodontology*, 85, 349-357, **2014**.
- [168] Beşkardeş, I.G., Demirtaş, T.T., Durukan, M.D., Gümüşderelioğlu, M., Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2012**.
- [169] Xue, J., He, M., Niu, Y., Liu, H., Crawford, A., Coates, P., Chen, D., Shi, R., Zhang, L., Preparation and in vivo efficient anti-infection property of GTR/GBR implant made by metronidazole loaded electrospun polycaprolactone nanofiber membrane, *International Journal of Pharmaceutics*, 475, 566–577, **2014**.
- [170] Tıǧlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665–1674, **2007**.
- [171] Chatelet, C., Damour, O., Domard, A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 22, 261-268, **2001**.
- [172] Kong, L., Gao, Y., Lu, G., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *European Polymer Journal*, 42, 3171–3179, **2006**.
- [173] Grasser, W.A., Orlic, I., Borovecki, F., Riccardi, K.A., Simic, P., Vukicevic, S., Paralkar, V. M., BMP-6 exerts its osteoinductive effect through activation of IGF-I and EGF pathways, *International Orthopaedics*, 31, 759–765, **2007**.

- [174] Xu, W.P., Shiba, H., Mizuno, N., Uchida, Y., Mouri, Y., Kawaguchi, H., Kurihara, H., Effect of bone morphogenetic proteins-4, -5 and -6 on DNA synthesis and expression of bone-related proteins in cultured human periodontal ligament cells, *Cell Biology International*, 28, 675-682, **2004**.
- [175] Yazid, M.D., Ariffin, S.H.Z., Senafi, S., Razak, M.A., Wahab, R.M.A., Determination of the differentiation capacities of murines' primary mononucleated cells and MC3T3-E1 cells, *Cancer Cell International*, 10, 42-53, **2010**.
- [176] Zhu, J.X., Sasano, Y., Takahashi, I., Mizoguchi, I., Kagayama, M., Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats, *The Histochemical Journal*, 33, 25–35, **2001**.
- [177] Hakki, S.S., Bozkurt, B.S., Hakki, E.E., Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243–250, **2010**.
- [178] Komori, T., Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2, *Osteoimmunology, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 658, 43-49, **2010**.
- [179] Suck, K., Behr, L., Fischer, M., Hoffmeister, H., van Griensven, M., Stahl, F., Scheper, T., Kasper, C., Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram[®]) using a rotating bed system bioreactor, *Journal of Biomedical Materials Research*, 80A, 268–275, **2007**.
- [180] Huang, W., Carlsen, B., Rudkin, G., Berry, M., Ishida, K., Yamaguchi, D.T., Miller, T.A., Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells, *Bone*, 34, 799– 808, **2004**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Elif SUNAL
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Bekar
E-posta : sunalelif@gmail.com
Adresi : Ankaralılar Caddesi İşbankalılar Sitesi No:15
Çayyolu/Ankara

Eğitim

Lise : Ankara Anadolu Lisesi (2007)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2012)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Mühendisliği Anabilim Dalı
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (orta)

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Doku mühendisliği, biyomalzemeler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

TÜBİTAK PROJESİ, Proje No: 114M132, Periodontal Rejenerasyon için Kitosan/Hidroksiapatit/PCL Bariyer Membranların Geliştirilmesi, 30,000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (Sözlü sunum), Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2-5 Eylül 2014.