

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**DAMAK YARIKLARININ İN SİTU DOKU MÜHENDİSLİĞİ İLE
ONARIMI: ALVEOLAR YARIK HAYVAN MODELİ
OLUŞTURULMASI VE FARKLI REJİMLERDE BİYOBOZUNUR
DOKU İSKELELERİ İLE ONARIMI**

Dr. Ömer EKİN

**UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İbrahim VARGEL**

**ANKARA
2014**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Plastik Rekonstrüktif ve Estetik cerrahi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim VARGEL
(Hacettepe Üniversitesi) **İmza**

Üye: Prof. Dr. Figen ÖZGÜR
(Hacettepe Üniversitesi) **İmza**

Üye: Doç. Dr. Ersoy KONAŞ
(Hacettepe Üniversitesi) **İmza**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile her zaman öğretici ve yol gösterici olan, tezimin yürütülmesi ve sonuçlandırılması boyunca hoşgörü, anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. İbrahim Vargel'e ve eğitim süreci boyunca ben de emeği geçen bütün değerli hocalarıma,

Çalışmanın histopatolojik analizini gerçekleştiren Prof.Dr. Petek Korkusuz'a

Mikrotomografi analizini gerçekleştiren Prof.Dr. Hamdi Çelik ve Alper Vatansever'e

Çalışmanın istatistiksel analizini gerçekleştiren Dr. Hüseyin Candan'a,

Çalışmam sırasında her türlü kolaylığı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına,

Bu çalışmaya destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne

Hayvan deneyleri boyunca beni yalnız bırakmayan bilgi ve becerisi ile yardımını esirgemeyen arkadaşım, can yoldaşım Dr.Ali Aliyev,

Hayatımdaki her sevincimi, başarıyı, mutluluğumu borçlu olduğum anneme ve varlığıyla bile en kötü zamanlarıma huzura dönüştürebilen kardeşlerim Zeynep ve Umut'a

En içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Ekin Ö., Damak yarıklarının in situ doku mühendisliği ile onarımı: Alveolar yarıklar hayvan modeli oluşturulması ve farklı rejimlerde biyobozunur doku iskeleleri ile onarımı. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2014.

Bu çalışmada, kemik iyileşmesi üzerine doğrudan etkileri olduğu bilinen ve kemik defektleri modellerinde sıkça kullanılan doku iskelesi modellerinden trikalsiyum fosfat polimeri Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü laboratuvarlarında üzerine kollojen eklenerek daha da kullanışlı hale getirildi. Bu geliştirilen doku iskelesi modelinin, diğer standart doku iskelesi (ϵ -kaprolakton) ve alveolar kemik defektleri tedavisinde altın standart olan otogreft ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 48'i histolojik ve radyolojik analizlerde, 16 tanesinde gen ifade düzeyi çalışmalarında kullanılmak üzere toplam 64 hayvan kullanılmıştır. Grup farketmeksizin hayvanların alveolar bölgesinde daha önce tanımlandığı üzere kritik boyutlu (7x4x3 mm) kemik defektleri oluşturulmuştur. Toplam 8 grupta denekler 2 farklı zaman diliminde incelenmiştir. (4 grupx2, n=48) Negatif kontrol grubu olarak seçilen grupta alveolar defektleri oluşturulup denekler başka işleme maruz bırakılmamıştır. Pozitif kontrol grubu olan otogreft grubunda ise deneğin iliyak kemiğinden alınan otogreft hasarlı bölgeye implante edilmiştir. Diğer iki gruplarda alveolar kemik defektleri, asıl geliştirilen doku iskelesi modeli olan Kollajen/ β -TCP ve standart doku iskelesi olan ϵ -kaprolakton ile rekonstrükte edilmiştir. 1. ve 4. aylarda kurban edilmiş hayvanların defekt bölgelerinden alınan örnekler önce makroskopik olarak ve sonrasında mikro-CT analizleri yapılarak yeni kemik dokusunun hacimsel değeri hesaplanmıştır. Yapılan mikro-CT incelemelerinde oluşan kemik hacmi bakımından Otogreft grubunda hem histolojik hem radyolojik analizlerde en iyi kemikleşmenin olduğu görülmüştür, ayrıca 4. ay gruplarındaki kemikleşme oranları 1. aylarındakilere göre daha fazla olarak saptanmıştır. Doku iskelesi olarak geliştirilen ve bu tez çalışmasının ana basamağını oluşturan Kollajen/ β -TCP grubunun sonuçları analiz edildiğinde diğer doku iskelesi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kemikleşme elde edilmiştir, Otogreft grubunda en yakın kemikleşme sonuçları elde edilmiştir. Örnekler mikro-CT incelemeleri

sonrasında histolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Bu incelemelerde hematoksilin, eozin ve masson trikrom ile boyanmış, kesitler defekt iyileşmesi, yeni kemik oluşumu ve doku cevabı açısından değerlendirilmiştir. Histolojik çalışmalardan elde edilen veriler 1. ve 4. aylarda otogreft grubunda hızlı bir iyileşmenin olduğunu gösterirken Kollajen/ β -TCP grubunun otogreft grubundaki yeni kemik oluşum değerlerine en yakın sonuçları verdiği saptanmıştır. Yine aynı şekilde gen ifade düzeyi çalışmalarında en iyi iki grubun otogreft ve Kollajen/ β -TCP olduğu görülmüştür. Sonuç olarak elde edilen bu veriler ışığında altın standart tedavi yöntemi otojen kemik grefti olmasına karşın, doku mühendisliği ve yöntemleri ile geliştirilen doku iskeleleride maliyet, donör saha morbiditeleri, hastanede yatış süreleri düşünüldüğünde alternatif bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Alveolar yarık, kritik boyutlu alveoler kemik defekti modeli, kemik doku mühendisliği, biyobozunur polimerler, ϵ -kaprolakton

ABSTRACT

Ekin Ö., Cleft palate repair with in situ tissue engineering: Creating alveolar cleft animal model and repair with different biodegradable tissue scaffolds, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Department, Ankara, 2014

In this study, the tricalcium phosphate polymer, a tissue scaffold known for its direct effects on tissue healing, and that is used commonly in bone defect models, was upgraded by adding collagen by the Hacettepe University Department of Bioengineering. This study aims to compare this new enriched tissue scaffold with the standard tissue scaffold (ϵ -kaprolakton) and autogeneous bone grafting, which is the gold standard in alveolar cleft treatment. In this study, 64 animals were used, 48 for histological and radiological analyses, and 16 for gene expression studies. Regardless of groups, a bone defect of critical size (7x4x3 mm) was created, as formerly defined. The subjects in 8 different groups were examined in 2 different time intervals (4 groupx2, n= 48). In the negative control group, alveolar defect was created on the subjects, and no further procedures were performed. In the positive control group (the autograft group), the autograft harvested from the iliac bone of the subject was implanted on the deficient area. In the other two groups, the alveolar bone defects were reconstructed by the newly developed Collagen/ β -TCP and the standard ϵ -kaprolakton tissue scaffolds. The specimens gathered from the defective areas of the sacrificed animals were examined first macroscopically in the 1st and 4th months, then by micro-CT, in which the volume of the new bone tissue was calculated. When the micro-CT images were examined with respect to the volume of the newly formed bone, the autogenous graft group was found to have the best ossification on both histological and radiological analyses. Also, the amount of ossification on the 4th month was detected to be more than the amount of ossification on the 1st month. When the results of the Collagen/ β -TCP group, the main component of this study, was analyzed, the increase in the rate of ossification was found to be statistically important, compared to the Standard tissue scaffold group. This was also the group whose ossification results were closest to the autogenous graft group. For the histological examination, the specimens were stained with hematoxylin, eosin and

mason trichrome stains; and the blocks were examined for healing of the defect, new bone formation and tissue response. These data show that there is a quick healing in the autogenous graft group in the 1st and 4th months, and the Collagen/ β -TCP group had the closest results in regard to the new bone formation. Likewise, in the gene expression studies, the best groups were the autograft and Collagen/ β -TCP group. In conclusion, these data show that although the gold standard for treatment is autogenous bone grafting, tissue scaffolds developed through bioengineering can be regarded as an alternative when cost, donor area morbidity, and length of hospital stay are considered.

Keywords: Alveolar cleft, critical size alveolar bone defect, bone tissue engineering, biodegradable polymers, ϵ -kaprolakton

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ALVEOLER YARIK	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etyoloji.....	3
2.1.3. Sınıflandırma.....	3
2.1.4. Alveolar Yarık Tedavisinin Tarihçesi.....	5
2.1.5. Alveoler Yarık Tedavisinin Hedefleri	6
2.1.6. Tedavinin Zamanlaması.....	7
2.1.7. Kemik Grefti Kaynağı.....	7
2.1.7.1. Otojen Kemik Greftleri	8
2.1.7.2. Allojenik Kemik Greftleri	9
2.1.8. Ortodontik Tedavi	10
2.2. KEMİK DOKU ANATOMİSİ HİSTOLOJİSİ	12
2.2.1. Kemik Doku Anatomisi	12
2.2.2. Kemik Doku Histolojisi	14
2.2.3. Kemik İyileşmesi	14
2.2.3.1. Primer Kırık İyileşmesi	15
2.2.3.2. Sekonder Kemik İyileşmesi.....	15
2.2.4. Kemik Belirteçleri.....	17
2.2.4.1. Alkalen Fosfataz (ALP).....	17
2.2.4.2. Transkripsiyon Faktörleri	17

2.2.4.3. Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx 2)	18
2.2.4.4. Matriks Proteinleri	19
2.2.4.5. Kemik Siyaloproteini (BSP).....	19
2.2.4.6. Kollajen 1 (COL1).....	19
2.2.4.7. Osteokalsin [OC (Kemik gla Proteini)].....	20
2.2.4.8. Osteonektin (SPARC)	21
2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	21
2.4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ	23
2.4.1. Tarihçe	23
2.4.2. Doku İşleminde Kullanılan Biyomalzemeler.....	25
2.4.3. Doku İskeleleri Hazırlama Teknikleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN DOKU İSKELELERİ MODELLERİ	29
3.1.1. Poli (L-laktat)/Poli (ϵ -Kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi ve Polimerik Blendlerin / Doku İskelerinin Hazırlanması	29
3.1.1.1. Poli (L-laktat)/Poli (ϵ -kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi.....	29
3.1.1.2. Polimerik Blendlerin Hazırlanması.....	31
3.1.1.3. Poli (L-laktat)/Poli (ϵ -kaprolakton) Doku İskelelerinin Hazırlanması	32
3.2. B-TCP-KOLLOJEN.....	32
3.3. SKAFOLDLARIN HAZIRLANMASI VE STERİLİZASYON	33
3.4. DENEY GRUPLARI	33
3.5. ANESTEZİ.....	35
3.6. CERRAHİ İŞLEM	35
3.7. CERRAHİ SONRASI İZLEM	36
3.8. ÖTENAZİ.....	36
3.9. MİKRO-BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (μ -CT) İLE RADYOMORFOMETRİK ANALİZ	37
3.10. HİSTOLOJİ VE HİSTOMORFOMETRİ ÇALIŞMALARI.....	38
3.11. GEN İFADE DÜZEYİ ÇALIŞMALARI.....	39
3.11.1. Dokudan Total RNA Saflaştırılması.....	39

3.11.2. Dokudan RNA İzolasyon Protokolü	39
3.11.3. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi	40
3.11.4. RT-PCR Programı.....	41
3.11.5. Gen ifade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi	41
3.11.6. Light-Cycler (LC) Deney Programı.....	43
3.11.7. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	45
4.1. MİKRO-BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (μ-CT) İLE RADYOMORFOMETRİK ANALİZ	45
4.2. GEN İFADE DÜZEYİ ÇALIŞMALARI.....	50
4.2.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi.....	50
4.2.2. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması	51
4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR	53
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
ALP	: Alkalen fosfotaz
Ark.	: Arkadaşları
BMP	: Kemik morfojenik protein
BDGF	: kemikten türetilmiş büyüme faktörü
BSP	: Kemik siyaloprotein
BALP	: Kemik alkalen fosfataz
CT	: Bilgisayarlı tomografi
COL-1	: Tip 1 Kollajen
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ECM	: Hücre dışı matriksi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FDA	: Food and drug administration
IL-1	: İnterlökin-1
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
mg.	: miligram
ml.	: mililitre
OC	: Osteokalsin
PHAs	: Polihidroksialkanoatlar
PDGF	: Trombositten üretilmiş büyüme faktörü
PCL	: Poli (ϵ -kaprolakton)
PLLA	: Poli (L-laktat)
Runx2	: Runt ilişkili transkripsiyon faktörü
RANKL	: Nükleer faktör kapa b ligandı reseptör aktivatörü
RhBMP-2	: Rekombinant insan kemik morfojenik proteini
SPARC	: Osteonektin

SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
TNF-a	: Tümör nekroz faktör alfa
TCP	: Trikalsiyum Fosfat
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
3D	: Üç boyutlu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no:

Şekil 2.1.	Kemik dokunun kesitsel anatomisi, Havers ve Volkmann kanalları.....	13
Şekil 2.2.	Kırık iyileşmesi dönemleri.....	15
Şekil 2.3.	Kemik onarımı.....	17
Şekil 2.4.	Runx2'nin regülasyonu ve etkilediği yollar.....	18
Şekil 2.5.	OC'nin regülasyonu.....	20
Şekil 2.6.	Kemik oluşumunun moleküler düzenleyicileri [60].....	21
Şekil 2.7.	Doku mühendisliğinin temel konsepti.....	22
Şekil 3.1.	Isı ve katalizör varlığında poli (L-laktat) polimerizasyon reaksiyonu.....	30
Şekil 3.2.	Isı ve katalizör varlığında poli (ϵ -kaprolakton) polimerizasyon reaksiyonu.....	30
Şekil 3.3.	Kollajen/ β -TCP doku iskelesinin mikro tomografik görüntüsü.....	33
Şekil 3.4.	Çalışmada kullanılan doku iskeleleri.....	33
Şekil 3.5.	7x4x3 mm lik standart otogteft alabilen alet görülmektedir.....	34
Şekil 3.6.	Cerrahi işlem.....	36
Şekil 4.1.	Defekt kontrol grubunun 1. Ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları.....	46
Şekil 4.2.	Otogteft grubunun 1. Ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları.....	46
Şekil 4.3.	B-TBC-kollojen grubunun 1. ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları.....	46
Şekil 4.4.	Kaprolakton grubunun 1. ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları.....	47
Şekil 4.2.	Runx2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.....	50

Tablo 4.6.	Her grup için cerrahi işlem bölgesinden alınan doku örneklerinin 7. gündeki Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP ve OSX genlerinin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik.....	52
Şekil 5.1.	1. ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları.....	56
Şekil 5.2.	4.ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları.....	57

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa no:
Tablo 2.1. Doku iskelesi fabrikasyon teknikleri.....	28
Tablo 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.....	41
Tablo 3.2. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program.....	41
Tablo 3.3. Spesifik Primer Dizileri ve UPL Prob Numaraları.....	42
Tablo 3.4. Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB Real-time PCR tepkime karışımı	42
Tablo 3.5. Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	43
Tablo 4.1. 1.ayda ki yeni oluşan kemik hacimlerinin defekt hacimlerine oranı.....	48
Tablo 4.2. 4.aydaki yeni oluşan kemik hacimlerinin defekt hacimlerine oranı.....	48
Tablo 4.3. Dokuların 1.ay histolojik verilerinin istatistiksel analizi	54
Tablo 4.4. Dokuların 4.ay histolojik verilerinin istatistiksel analizi.....	55

1. GİRİŞ

Yarık dudak ve damak, baş-boyun bölgesinin en sık rastlanılan doğumsal malformasyonları arasındadır. Görülme sıklığı; ırk, coğrafik konum, etnik köken ve cinsiyet gibi bazı faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Sıklığı,1000 canlı doğumda yaklaşık 1 olarak tahmin edilmektedir. Ülkemizde yarık dudak/damak görülme insidansı binde 0,95 olarak bildirilmiştir [1]. İzole olarak görülebileceği gibi, kromozomal, yapısal anomalilerle; bunun yanında 300'ü aşkın sendromla beraber de gözlenebilir [2-5].

Alveoler ark yarıkları, damak-dudak yarığı anomalilerine eşlik eder. Alveoler ark yarıklarının, en yaygın kabul görmüş cerrahi tedavisi otojen kansellöz kemik greftlerinin kullanılması yoluyla gerçekleştirilen onarımdır. Kemik grefti için çeşitli donör alanlar kullanılmasına rağmen en sık tercih edileni iliyak bölgedir. İliyak kemik greftlerinin alınması ve greftin alıcı yatağa yerleştirilmesi hematoma, duyu siniri yaralanması, skar oluşumu ve enfeksiyon gibi olası komplikasyonları da beraberinde getirmektedir, ayrıca ameliyat süresinin uzun olması, maliyet, uzun yatış süreleri, kemik dokunun kaybı veya rezorpsiyonu gibi durumlarda söz konusudur [6]. Bu gibi kısıtlamalar ve otojen doku transferi ile elde edilebilecek dokunun sınırlı olması nedeniyle doku mühendisliği ile kemik doku alternatiflerinin üretilmesi gündeme gelmiştir [4].

Kemik doku mühendisliği için en kritik gelişmelerden biri Urist tarafından 1965 yılında kemik morfojenik protein (BMP) nin bulunması ve popularize edilmesidir [7]. Kemik doku oluşumunu tetikleyen ve düzenleyen bir maddenin keşfi heyecan uyandırmış ve bu maddenin Wozney ve ark. tarafından klonlanması ile in vivo uygulanabilir olması kemik araştırmalarına ciddi bir ivme kazandırmıştır [1].

Diğer bir taraftan doku iskelesi amacıyla kullanılan materyaller bakımından da gelişmeler devam etmiş ve günümüzde trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit, polilaktik asit, polilaktik asit ko-glikolik asit ve bileşenleri sıklıkla kullanılmaktadır [8].

Scnell ve ark. 2007 yılında yayınlanan çalışmalarında polikoprolakton ve kollojen/polikoprolakton monofiberler yoluyla sinir dokusunda aksonal uzama ve sinir dokusu üretimi ortaya koymuşlardır [9].

Kemik doku mühendisliği için geliştirilen doku iskelelerinin hem osteoindüktif hem de osteokondüktif özelliklerinin olması beklenir, ancak günümüzde bu özellikleri barındıran ideal bir doku iskelesi bulunmamaktadır.

Sunulan tez kapsamında, damak yarıklarının onarımında kullanılmak üzere farklı rejimlerde biyobozunur doku iskelelerinin geliştirilmesi ve yaratılacak hayvan modellerinde (damak yarıklı sıçanlar) bu materyallerin kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Deney gruplarında kullanılmak üzere Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik bölümü tarafından yeni bir doku iskelesi (B-Trikalsiyum fosfat-kollojen) geliştirilmiştir. Bu çalışma ile geliştirilen yeni polimerin diğer standart doku iskelesi (Kapolakton) ve alveoler yarığın altın standart tedavi yöntemi olan otogreft ile karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Hayvan modellerinde uygulanan bu doku iskelelerinin kemik doku rejenerasyon kabiliyetleri; histolojik, radyolojik ve gen ifade düzeyi çalışmalarıyla incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALVEOLER YARIK

2.1.1. Epidemiyoloji

Yarık dudak/damak insidansı etnik köken ve coğrafi bölgeye göre değişmekle beraber beyaz yenidoğanlarda yaklaşık bin canlı doğumda 1; izole yarık damak ise binde 0,5 olarak gözlenmektedir. Japon halkında bu oran binde 2,1; Çin toplumunda binde 1,7 olarak bildirilmiştir [4]. Avrupa toplumunda, referans alınan kaynağa ve araştırmanın yapıldığı ülkeye göre değişen değerler olmakla beraber bin canlı doğumda 1.2 ile 2 arası olarak rapor edilmiştir [10]. Ülkemizde yarık dudak/damak görülme insidansı binde 0,95; izole yarık damak görülme insidansı ise binde 0,77 olarak bildirilmiştir [4]. Eşlik eden malformasyonlar yarık dudak/damak hastalarının %35'inde görülürken, yarık damak hastalarının %54'ünde görülmektedir [11]. Yarık dudak/damak erkeklerde daha sık görülürken yarık damakta tam tersi bir ilişki vardır.

2.1.2. Etyoloji

Yarık oluşumunda genetik faktörlerle etkileşen birçok çevresel faktörün, sadece yarık dudak/damak malformasyonlarını değil tüm kraniyofasyal yarıkların oluşum mekanizmalarında yer aldığı bilinmektedir. Bu faktörler radyasyon [12], enfeksiyon [13], annenin metabolik bozuklukları [14], ilaçlar ve kimyasallar şeklinde gruplandırılabilir. Teratojenik potansiyeli olan ve konjenital malformasyon sıklığını arttırdığı bilinen ilaçların arasında; antikonvülzanlar, kemoterapi ilaçları, steroidler ve sedatifler, retinoidler sayılabilir. Teratologlar, birçok faktörün birçok yolak üzerinden etki etmesi gibi bir problemle karşı karşıya kaldıklarından belirli bir yarığın oluşumunu evrensel olarak açıklayan basit bir cevap bulamamışlardır.

2.1.3. Sınıflandırma

Sınıflandırma sisteminin amacı, yarıkları tanımlanmış kriterler doğrultusunda değerlendirme ve kayıt tutma için gruplara ayırmaktır. Sistem, tedavi planlamasında veya sonuçlara dayalı prognostik değerlendirmede klavuz olabilir. Birçok

sınıflandırma sistemi tanımlanmıştır. Davis ve Ritchie [15] en eski sınıflandırma sistemde yarıklar, alveolar çıkıntı baz alınarak kategorize edilmiştir ve 3 gruba ayrılmıştır: grup 1, “prealveolar yarıklar”; grup 2, “post alveolar yarıklar” ;grup 3 ise alveolar çıkıntıyı kapsayan bütün yarıklar.

Veau [16], 1931 yılında morfolojik görünümlere ilişkin 4 gruplu bir sınıflandırma sistemi ortaya attı. Tip 1 sadece yumuşak damak yarığını, tip 2 yumuşak ve sert damak yarığını, tip 3 dudağın alveolar arkın ve damağın tek taraflı yarığını, tip 4 ise dudağın, alveolar arkın ve damağın iki taraflı yarıklarını kapsamaktadır.

Pruzansky [17],yarıkları 4 genel kategoriye ayıran bir öneri getirdi: sadece dudak; dudak ve damak; sadece damak; damağın konjenital yetmezliği. Her bir kategoride komplet, inkomplet, yumuşak vb. terminolojiyi, her bir yarığa daha ayrıntılı tanımlamada kullandı. Bu sınıflamada alveolar bölgenin durumu özel olarak dikkate alınmadığı gibi tutulumuda ayrı bir kategori oluşturmamaktadır. Pruzansky, dudaktaki yarıkların oluşumunun derecesiyle, alveolar bölgenin tutulumu arasında sabit bir ilişki olduğunu gözledi. Dudaktaki yarıkların tam olmaya ne kadar yaklaşırsa, alveolar bölgenin tutulum derecesinin okadar fazla olacağını, bununda dudak ve damak embriyolojisinin özelliklerinden kaynaklandığını savundu. Dördüncü kategoriyi herhangi bir etyolojiden kaynaklanan velofarengal yetmezlik olarak oluşturdu.

Kernehan ve Stark [18],embriyolojik gelişim üzerine kurulmuş bir sınıflandırma geliştirdi. 'Incisive' foramenin mezodermal giriş sonucu oluşan primer damakla, palatin rafların orta hatta kaynaşması sonucu oluşan sekonder damak arasında bir bağlantı noktası olmasından yola çıkarak grupları alveolar bölgenin kendisine göre değil de bu noktaya göre oluşturdu. Gruplar, incisive foramenin anteriorundakiler (primer damaktaki mezodermal giriş kusuru oluşan),incisive foramenin posteriorundakiler (sekonder damak birleşme kusuru sonucu oluşan) veya bu iki embriyolojik olayın kombinasyonu sonucu ile oluşanlar olarak belirlendi. Bunun yanında yarığın tanımlamak için daha ayrıntılı terminolojide eklendi. Kernehan daha sonra önceki çalışmasına dayanan sembolik bir sınıflandırma önerdi. Bu sınıflandırmada, dudak ve damak, her bir ayağının 3 kareden oluştuğu ve ayakların birleşme noktasındaki halkanın da incisive forameni sembolize ettiği bir ‘Y’

tarafından temsil edilir. Dudağı 1.ve 4. kareler; alveolar bölgeyi 2.ve5. kareler; primer damağı 3.ve6. kareler;incisive foramenin posteriorundaki sert ve yumuşak damağıda 7., 8. ve 9. kareler oluşturur.

Kriens [19] tutulan anatomik bölgeye göre dudağın, alveolar bölgenin ve damağın yarıklarını temsil eden LAHSHAL kodlaması önerdi. L; dudağı, A; alveolar arkı, H; sert damağı, S; yumuşak damağı temsil eder. Yumuşak damağın yarıklarını tek taraflı olarak ele aldığından tek harf şeklinde; sert damak, alveolar ark ve dudak yarıklarını çift taraflı olarak ele aldığından iki yanlı olacak şekilde kodlamıştır. Büyük harfleri komplet, küçük harfleri inkomplet olarak özetlemiştir.

Zamanla, yarık dudak ve damağı gruplandırmak amacıyla avantajları ve eksiklikleride olan birçok kayıt ve sınıflandırma sisteömi geliştirilmiştir, ancak evrensel olarak kabul edilip edilmemesi ve kodlama veya sınıflandırma sisteminin standart olarak kullanılıp kullanılmaması en büyük sorunu oluşturmuştur.

2.1.4. Alveolar Yarık Tedavisinin Tarihçesi

1901'de Von Eiselsberg'in ([20]) beşinci parmağın kemik ve yumuşak dokusunu pediküllü olarak yarık bölgesine getirerek ilk alveolar yarık tamirini gerçekleştirdiği söylenebilir. Lexer [21] 1908'de ilk defa vaskülarize olmayan kemik kullanarak alveolar yarık onarımı yapmıştır. Sonrasında 1914'te Drachter [22] tarafından tibial kemik grefti ile onarım denenmiş ancak pek kabul görmemiştir. Veau [23] yarık dudağın ve damağın kapatılmasının, yarık olan ve anormal olan doku ve tabakalarının her birinin normal anatomiye göre onarımını ve rekonstrüksiyonunu içermesi gerektiğini belirtmiştir. Wassmund 1955 yılında alveoler yarığın nazal ve oral tabakalarla tümüyle kapatılmasının sağlanmasının önemini vurgulamıştır. Veau'nun ortaya koyduğu gereklilikler, Schmid'in 1951 yılında, kemik grefti ile alveoler yarık onarımını tam anlamıyla önerip gerçekleştirdiği zamana kadar karşılanmamıştır. O zamandan beri birçok cerrah alveoler kemik greftleme üzerine farklı yöntemler tanımladı. Nordin ve Johansson, Schrudde ve Stellmach, Schuchardt ve Pfeifer [24], Boyne ve Sands [25] bunların bazılarıdır. Günümüzde alveoler yarık tedavisinin kabul görmekte olan yaklaşımı,

kalıcı kanin dişler sürmeden önceki karma dişlenme dönemi olan 6-12 yaş aralığında otolog kemik grefti kullanılarak gerçekleştirilen onarımdır.

2.1.5. Alveoler Yarık Tedavisinin Hedefleri

Alveoler yarık tedavisinde hem fonksiyonel hemde estetik olarak iyi sonuçlar elde etmek hedeflenir [26]. Alveoler segmentler ve yarık arasındaki sürekliliği ve bütünlüğü sağlamak greftleme nasıl ve ne zaman yapılırsa yapılsın belirli avantajlar sunar. Öncelikle arkın stabilitesini sağlayarak alveoler parçaların kollapsını engeller. Böylece ortodontik stabilite de artmış olur. Greftleme diş sağlığı açısından da önemlidir. Kanin ve lateral kesicilerin ark içine daha stabil olan alveoler kemiğe sürmesinin sağlanması için alan yaratır ve yarık komşuluğundaki dişler içinde kemik destek sağlamış olur. Kemik greftleme maksiller ark genişliği ekspansiyon ile sağlanana kadar genellikle ertelenir ve bunun sonrasında konulan greft de relapsı önleme açısından önemlidir. Uzun vadeli çalışmalarda yarığa komşu olan dişlerin kemik greftlemesi gerçekleşmediği zaman otuzlu veya kırklı yaşlarda kaybedildiğine dair veriler bulunmaktadır. Ayrıca lateral kesicinin protez ile rehabilitasyonu fikse edilmiş bir köprü açısından komşu dişlerin stabilitesini veya osseo-entegre implant yerleştirilmesi açısından da yeterli bir kemik rezervi gerektirmektedir [27].

Greftleme sadece alveoler arkın sürekliliğini değil ayrıca maksillanın piriform kenarındaki devamlılığında sağlar. Böylece nazal alar tabanında destekleyerek burun desteğini ve sağlamlığını arttırmış olur. Bunun sonucunda doğrudan bir estetik kazanç sağladığı gibi, rinoplasti ameliyatlarının yapıldığı döneme yönelik de uzun vadeli etkileri oluşmaktadır [28].

Nazolabial fistüller ve damak fistülleri damak onarımı sonrasında sıklıkla mevcuttur. Alveoler defektin greftlemesi rezidüel oronazal fistüllerin kapatılmasına olanak verir. Alveoler bölgedeki fistüllerin onarımı, kemik grefti olmadan yapılabilece de başarı şansı daha azdır. Bunun ağız hijyeni ve konuşma açısından da potansiyel faydaları vardır. Birçok yarık hastasında nazal boşluk ve sinüsteki reflüye bağlı olduğu varsayılan kronik üst solunum yolu ve sinüs hastalığı bulunmaktadır. Labial ve palatal düzeydeki rezidüel fistüllerin konuşma artikülasyonuna ve nazaliteye etkisinin olabileceğini vurgulayan literatür bilgisi bulunmaktadır. Bu fistüllerin

kapatılmasının ve yarığın greftlenmesinin nazal emisyonu ve nazaliteyi düzeltildiğine dair çalışmalar [29] olduğu gibi velofarengeal fonksiyonlarda düzelme sağlandığını gösteren çalışmalarda vardır [30].

2.1.6. Tedavinin Zamanlaması

Alveoler yarığın tedavisinde belkide en tartışmalı konu greftlemenin ne zaman yapılacağı konusudur. Geleneksel literatürde terminoloji uyumsuzluğu bulunmaktadır.

Kronolojik olarak alveoler yarığın tedavi seçenekleri primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer onarım 2.yaştan önce yapılan onarım olup dudak onarımı ile aynı zamanda olabildiği gibi ayrı bir ameliyat olarak dudak onarımından sonra damak onarımından önce de yapılabilir. Erken sekonder onarım primer dişlerin tamamen çıkımından sonra kalıcı dişler çıkmaya başlamadan önce yapılan onarım olarak bazı kaynaklarda belirtilmiştir. Bu dönem yaklaşık 2-6 yaş arasındaki dönemdir. Bu dönemde yapılan onarımın iyi kemik şekillenmesine olanak verdiği ve merkezi kesici dişlerin kanin dişte olduğu kadar ortodontik hareketlenmesine olanak sağladığı düşünülmektedir [31]. Asıl sekonder onarım ise yaklaşık 6-12 yaş arasında karma dişlenme döneminde yapılan onarımdır. Onarım 12 yaşından sonra yapıldığında genellikle geç sekonder onarım veya tersiyer onarım şeklinde adlandırılır. Günümüzde yaygın olarak kabul görmüş en uygun tedavi biçimi sekonder onarımdır.

2.1.7. Kemik Grefti Kaynağı

Kemik greftlerinin sık kullanılan kaynakları alveoler yarıklar içinde geçerlidir; ancak greftin intraoral ve intranasal yerleşimi göreceli olarak daha az elverişlidir ve sonradan yerleştirilen implantlar kemik rezervinin çok iyi bir şekilde idame ettirilmesini gerektirir.

2.1.7.1. Otojen Kemik Greftleri

Alveoler yarık onarımında hangi donör alanın tercih edileceği konusunda henüz görüş birliği yoktur. Yeterli miktarda kemik içeren donör alandan kolayca alınabilen greft, iyi vaskülarize olup alıcı yatağa uyum sağlamalı ve dış çıkımına engel olmamalıdır. Ayrıca ameliyat sonrası morbidite ve komplikasyonları az olmalıdır. En sık tercih edilen otojen kemik greft kaynakları: iliyak krest, kalvaryal kemik, kostalar, mandibular simfizis ve tibiadır.

Greft olarak kullanılacak kemik, en yaygın olarak iliyak krestten elde edilmektedir [25]. Otojen kemik greftleri içerisinde iliyak krest yaklaşık %90 olarak rapor edilmiş başarı oranıyla ‘‘altın standart’’ olarak kabul edilmektedir. [32, 33] İliyak kemik greftinin potansiyel avantajları morbiditesinin düşük olması çocuklarda bile yeterli miktarda bulunabilmesi, fazla miktarda canlı osteoblastik hücre içermesi (kansellöz kemik), iki ekibin aynı anda çalışmasına olanak vermesi, hasta tarafından kabul edilebilir olmasıdır. En önemli sorun ise 1-2 hafta kadar sürebilen aksamaya neden olabilecek ameliyat sonrası eşlik eden ağrıdır.

Kortikal kemik, konulan greftin içine doğru yeni vasküler yapılar oluşturur. ‘‘Osteokondüksiyon’’ ile konulmuş olan kemik grefti yıkılırken yeni kemik oluşumu başlar. Kortikal kemik maksiller parçaları iyi stabilize etse de kansellöz kemik çevre dokular daha iyi uyum sağlayıp maksilla ile birlikte büyür daha az rezorpsiyon gösterir ve dış çıkımında izin verir.

Kemik greft, iliyak krest alanından farklı yaklaşımlarla alınabilir. Osteotomlar testere ve kemik iliği elde etme aletleri kullanılabilir. Bazı yazarlar tarafından lateral yaklaşım önerilmiştir; ancak bu işlem iliotibial traktüse zarar vermekte yürüme bozukluğu ve postoperatif ağrı sıklığını arttırmaktadır. Teorik olarak 20 yaşına kadar büyümesini tamamlayan anterior kreste zarar vermektense kaçınmak en doğrusudur; ancak krestin üzerindeki kıkırdak örtünün yaklaşık 9 yaş civarında kalınlığı 1 cm’e kadar gerilemiştir. Bu zaman diliminde kreste zarar vermek büyümede bozukluğa ve krestin kozmetik deformitesine neden olabilir. Krestin longitudinal olarak split ederek alttaki kansellöz kemik iliğine ulaşmak bu yaş grubundaki hastalarda uygulanmış ve büyümede değişiklik gözlenmemiş, lateral subkrestal yaklaşıma göre daha az yürüme bozukluğu rapor edilmiştir.

Kalvaryal kemik, cerrahi sahaya yakınlığından neredeyse ağrısız oluşundan ve hızlı iyileşme süreci göstermesinden dolayı birçok cerrah tarafından kullanılmıştır, kalvaryal kemiklerin greft olarak başarısı farklı çalışmalarda değişik düzeylerde görülmektedir. Bu greft alma tekniği ile olabilir. “Diploik” kemik içeren greftlerin kalvaryumun yüzeyinden primer olarak kortikal kemiği traşlayan yüksek hızlı döner cihazla alınan greftlere göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir; fakat diploik kemik oranı en fazla olacak şekilde alınsa bile, sonuçlar iliyak krest kemiğinden alınan greftlerinki kadar iyi olmayabilir. İki ayrı ekibin aynı anda çalışması mümkün değildir; ancak tek ekip varsa iliyak kemik greftin kinden daha hızlı alınabilir. Başka bir yönüde insizyonun saç çizgisi içinde gizlenmesinden dolayı kozmetik bir avantaj olduğudur. Kalvaryal kaynaklı kemik greftlemenin potansiyel dezavantajları bulunmaktadır. Birçok çalışmada morbiditenin minimal olduğu belirtilse de hastalar ve aileleri tarafından algılanan riskte bir artış olduğu kesindir. Diploik kemik hacmindeki kısıtlılık nedeniyle de, geniş ve bilateral yarıklarda tercih edilmesi uygun olmayabilir.

Kosta grefti geçmişte kullanılmış olsa da, hızlı rezorbe olması ve dış çıkımına izin vermemesi nedenleriyle yaygınlığı azalmıştır. Ayrıca pnömotoraks ve enfeksiyon gibi donör alanı ilgilendiren riskleride vardır. Tek insizyon ile bir veya birden fazla kostadan kemik ve/veya kırıkta grefti alınabilmesi en önemli avantajıdır.

Mandibula simfiziside donör alan olarak kullanılmıştır. Membranöz bir kemik olduğundan minimal rezorpsiyon gösterdiği ve hızlı revaskularize olduğu düşünülmektedir. Sıklıkla mevcut greftlerin hacimlerinin artırılması amacıyla kullanılmıştır. Ameliyat alanına yakın olma gibi bir avantajı olsada bu alandan alınacak kemik sınırlıdır.

2.1.7.2. Allojenik Kemik Greftleri

Herhangi bir otojen alandan kemik almak için gereken zamanı ve morbidite riskini ortadan kaldırmak amacıyla allojenik kemik te potansiyel bir greft materyali kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalar allojenik kemiğin sekonder alveoler yarık defektlerini greftlemek için başarılı bir şekilde kullanılabileceğini otojen

kemikle ulaşılabilinen başarılı sonuçlar elde edilebileceğini göstermiştir. Marks, köpeklerde allojenik ve otojen kemik greftleri ile maksiller alveolar yarık onarımı üzerinde yaptığı araştırmada otojen kemiklerin %94 yoğunluk kazandığı, allojenik kemiklerin ise ancak %30 yoğunluğa ulaşabildiğini gözlemlemiştir. Genel olarak otojen kemik greftinin iyileşmesindeki mekanizma, allojenik olandan daha farklıdır. Otojen kemik greftleri iyileşme aşamasının erken döneminde anjiyoplastik bir aktivite başlatırlar ve transplante edilen hücrelerin bir kısmı canlılığını koruyarak daha hızlı bir şekilde yeni kemik oluşumunu sağlar. Buna karşı allojenik kemik greftleri greftle beraber taşınan canlı hücre olmadığından daha yavaş revaskularizasyon gösterirler. “Osteoindüksiyon” yoluyla yeni kemik oluşumunu sağlayan allojenik kemik greftlerinin çevre dokuya uyumu bu nedenle daha uzun zaman almaktadır. Nique 20 unilateral alveolar yarık hastasının allojenik kemik grefti ile onarımı sonrasında, tüm hastalarda kemik-greft köprüleşmesi ve yarıklarda kapanma gözlemlemiştir. Yine bu hasta grubunda, kanin dişleri çıkmamış 8 hastanın 7 sinde dişlerin daha sonra greft içinden büyüdüğü gözlenmiştir. Gözlem süresi kısa olduğundan dişlerin ve bu greftlerin uzun dönemdeki sonuçları bilinmemektedir. Allojenik kemik kaynaklarının aynı zamanda HIV, HBV gibi yavaş virüs enfeksiyonu ajanı bulaştırma gibi teorik bir riskide vardır. Matematiksel olarak risk çok düşük de olsa, bu hastaların ve ailelerin dikkatini çekebilir. Allojenik kemik greftlerinin antijenik özellikleri düşük olsada rejeksiyon riskleri mevcuttur. enfeksiyona direnç göstermediklerinden enfeksiyon sonucu kaybedilebilirler. Son dönemlerde allojenik greftlerin hazırlanmasındaki yeni gelişmeler ile enfeksiyon ajanlarının taşınma ve antijeniteye bağlı rejeksiyon risklerinin azaltılmasında önemli ölçüde yol katedilmiştir. Özellikle “solvent dehidrate” allojenik kemik greftlerinin liyofilize taze dondurulmuş greftlere oranla daha güvenli oldukları gösterilmiştir.

2.1.8. Ortodontik Tedavi

Alveolar yarık hastalarının tedavisinde ortodonti önemli bir yer işgal etmektedir. Tedavi süreci erken başlamaktadır. Bebeklik döneminde içeri çökmüş küçük maksiller segmentin genişletilebilmesi için maksiller ortopedikler kullanılabilir ve bu sayede alveolar yarık alanı küçültülebilir.

Yarık segmentlerinin ekspansiyonu ve ekspansiyon ile greftleme arasındaki ilişki bakımından literatürde bir anlaşmazlık bulunmaktadır. Birçok yazar, ameliyat öncesi ekspansiyonu, direnci azaltarak nazal tabanın kapatılması için yarık alanına ulaşımı rahatlatması daha iyi post operatif hijyen sağlaması ve oronazal fistüllerin yeniden açılma ihtimalini azaltması yönlerinden tercih etmektedir. Ameliyat öncesi ekspansiyon aynı zamanda bilateral yarık hastalarında greft başarısını kötü yönde etkileyebilecek travmatik oklüzyonu ortadan kaldıran premaksiller segmentin ortopedik hareketine izin vermektedir. Alveoler kemik greftlemeye hazırlık amacıyla ortalama 4-6 ay önceden ortodontik tedavi başlanmalıdır. Ortodontik tedavi ile küçük maksiller segmentin seviyelenmesi, maksiller arkın desteklenmesi ve posterior çapraz kapanışın engellenmesi sağlanır. Bu tedavide, maksiller arka uygulanan sabit veya hareketli apereyleri ile transvers yön uyumsuzluklarının çözümlenmesinin yanında, anteroposterior uyumsuzluk durumunda yüz maskesi uygulanarak maksiller protraksiyon da gerçekleştirilebilir. Bu dönemde anterior ve posterior maksiller arklar genişletilerek çapraz kapanış düzeltilmeye çalışılır.

Greftleme sonrası ekspansiyonu destekleyen yazarlar, greftin iyileşme sırasında dinamik bir yükün altına konulduğunda daha iyi kemik konsolidasyonu oluşması, kapatılması gereken daha küçük bir yumuşak doku defektinin olması, yeterli kemik hacmi sağlanmasında daha az zorluk çekilmesi ve kemikte daha hızlı rejenerasyon sağlayacak daha dar bir defekt oluşması gibi avantajların üzerinde durmaktadır. Her iki yaklaşımda karma dişlenme döneminde otojen kemik greftlemesi ile beraber başarı ile uygulanmıştır. Pratik olarak her iki yaklaşım da mantıklıdır, karar bireysel klinik duruma göre verilmelidir. Alveoler arkta kollaps gözlenen küçük tek taraflı yarıklarda ameliyat öncesi ekspansiyon ve sonrasında greftleme daha kolay olacaktır. Bu durumda ekspansiyon, defektin genişliğinin arttırmayabilir ve segmentlerin uygun dizilime getirilmesi yarığa komşu olan dişlerin hijyenini sağladığı gibi yarık bölgesine ulaşımında rahatlatır. Bu durumda ameliyat öncesi ekspansiyonun bitiş noktası iyileşmiş ark formudur, çapraz kapanışın düzeltilmesi gerekmez. Lateral segmentlerin kollapsı ile kendini gösteren bilateral yarıklarda da ameliyat öncesi ekspansiyon yapılabilir. Lateral segmentlerin ekspansiyonu, anterior pozisyondaki premaksillaryı, arkla daha iyi bir ilişki haline getirerek ark formunu iyileştirebilir. Ark formu ve segmentlerin hizalanması ve

dental gelişimi iyi olan hastalarda, bukkal çapraz kapanış olsa bile preoperatif ekspansiyon için greftlemeyi ertelemek mantıksız olacaktır. Bu çapraz kapanış antero-posterior uyuşmazlığa bağlı olabilir. Transvers eksikliğe bağlı olsalar bile, greft sonrası ekspansiyonla kolayca tedavi edilebilirler. Kemiğin iyileşme döneminden sonra yapılan ortodontik tedavi, daimi dişlerin pozisyonlarının düzeltimini ve dişlerin greftlenmiş olan alveoler yarık alanına hareketini içermektedir. Ayrıca kanin dişin greftlenmiş alana sürmediği durumlarda, ortodontik traksiyonda uygulanabilmektedir.

2.2. KEMİK DOKU ANATOMİSİ HİSTOLOJİSİ

2.2.1. Kemik Doku Anatomisi

Kemik doku bağ dokunun rijit formu olup iskeletin büyük bir kısmını oluşturarak vücudun destek sisteminin başında gelmektedir. Vücutta destek ve koruma fonksiyonları dışında kan hücrelerinin yapımı ve bazı minarellerin depolanması fonksiyonlarından birkaçıdır. Kemikler ayrıca kasların tutunma yerleri oldukları için lokomotor sistemin önemli bir kısmını oluştururlar [34].

Uzun kemiklerin orta bölümü diafiz (diaphysis), iki uç bölümü epifiz (epiphysis), bunların arasında kalan kısa bölüme ise metafiz (metaphysis) olarak adlandırılır.

İnsan iskeleti embriyolojik olarak iki ayrı kemik tipinden oluşmuştur. Enkondral kemikler, kıkırdak öncünün kemikleşmesi ile oluşurken, membranöz kemikler mezenkimal öncülerin direkt ossifikasyonu ile oluşur. Enkondral kemiklere örnek apendiküler iskeletin uzun tübüler kemikleridir. Membranöz kemikler ise aksiyal ve kraniofasiyal iskelette bulunurlar [35].

Kemiklerin eklem yüzeyleri dışında kalan kısımları periosteum denilen zar ile sarılıdır. Periosteum dışta fibröz ve içte osteojenik olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bu iki katlı membran yapı kırık iyileşmesi ve anjiyogeneizde önemli role sahiptir. Fibröz kısım eklem kapsülü ile devamlılık göstermekte iken damarlanmadan zengin olan osteojenik tabaka kemikle devamlılık göstererek kemikte enine büyümeye katkıda bulunur [36].

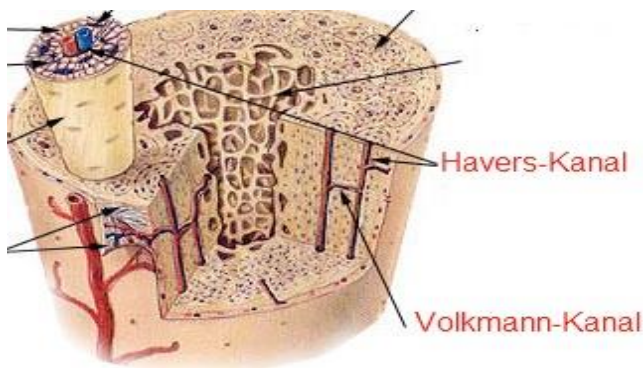
Kortikal kemiğin iç yüzü endosteum denilen fibröz bir örtü ile kaplıdır. Görevi tam olarak bilinmemekle beraber kemik iyileşmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Kortikal kemiğin içindeki kavitede, kansellöz kemik ve kemik iliği bulunur. Kortikal kemik ve kemik iliği için destek vazifesi gören kansellöz kemik, değişik kalınlıklarda trabeküler kemikten oluşmuş olup en kalın yerlerinde olgun osteonları barındırır.

Morfolojik olarak kemik doku iki kısımdan oluşur:

- Kortikal (kompakt) kemik
- Kansellöz (spongiyöz) kemik

Tüm kemiklerin kortikal ve kansellöz komponentleri vardır. Kompakt kemik kemiklerin dış kısımlarını oluşturur. İçerisinde *Havers kanalları* denilen çok sayıda ince kanalcıklar mevcuttur. Bu kanallarda kemik dokusunun kılcıl damar dolaşımı (kapillerler) bulunur. Havers kanalları yanlara doğru uzanan *Volkman kanallarının* içerisinde yer alan, kemik iliği ile periost arasında uzanan damarlarla anastomoz yaparlar, çok sayıda enine kanallar aracılığı ile birbiriyle bağlantılıdır ve kemiğin dış yüzeyine kadar uzanır. Her Havers kanalını saran lakün kemiğin temel ünitesi olup osteon ya da Havers sistemi olarak bilinir [35] (Şekil 2.1).

Kansellöz kemik, kemiklerin iç kısımlarında yer alır. Bu tabakada kemik matriksi yük taşıma amacıyla basınç ve gerilmenin vektörüne uygun olarak trabekülalar oluşturur. Uzun ve yassı kemiklerde bu trabekülalar arasında bulunan boşluğa meduller boşluk denir. Meduller boşlukta hematopoetik kök hücrelerden zengin kemik iliği bulunur [35].



Şekil 2.1. Kemik dokunun kesitsel anatomisi, Havers ve Volkman kanalları

2.2.2. Kemik Doku Histolojisi

Kemik doku mineralize olması yönüyle bağ dokusu olarak benzersizdir. Biyokimyasal olarak %35 organik matriks ve %65 inorganik elementlerden oluşur. İnorganik komponenti kalsiyum hidroksiapatit oluşturur. Kalsiyum hidroksiapatit kemik dokusuna sertlik ve dayanıklılığını verir ve tüm vücudun kalsiyum rezervinin %99'unu, fosfor rezervinin %85'ini ve sodyum ve magnezyumun %65'ini oluşturur. Kemik dokunun organik kısmını ise hücreler ve matriks proteinleri oluşturur. Bu hücreler osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlardır. Bu hücrelerin oluşum ve uyarılmasını çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri düzenler [37].

Osteoblastlar kemik matriksinin inorganik bileşenlerinin (Tip 1 kollojen, proteoglikan, osteopontin ve osteokalsin gibi glikoproteinler) sentezinden sorumludur. Bu hücreler kemik yüzeyinde epitel hücreleri gibi yanyana dizilirler. Sentez faaliyetleri ile beraber alkalin fosfat (ALP) seviyesi artar ve sitoplazma bazofilik hale gelir. Osteoblastlar, yeni sentez edilmiş matriks ile çevresi sarıldığında osteosit adını alırlar.

Osteositler, osteoblastlardan köken almış hücreler olup matriks lamelleri arasında bulunan lakünalar içine yerleşmişlerdir. Sitoplazmik uzantıları sayesinde çevre matriksten beslenebilmeleri mümkün olur. Bu hücreler kemik matriksin devamlılığı için aktif rol alırlar ve osteositlerin ölümü ile birlikte matriks rezorpsiyonu tetiklenir.

Osteoklastlar mononükleer fagositik sistem kapsamı içinde yer alan çok büyük, ileri derecede dallanmış hareketli hücrelerdir. Bu hücreler çok çekirdekli olup kemik rezorpsiyonunun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış olan *Howship lakünası* adı verilen boşluklarda bulunurlar. Osteoklastlar asidofilik ağırlıklı olup kemik matriksini etkileyen asit, kollajenaz gibi lizozomal enzimleri salgılayarak organik matriks bileşenlerinin yıkımını gerçekleştirirler [38].

2.2.3. Kemik İyileşmesi

Herhangi bir zorlama ile kemiğin bütünlüğünün bozulması durumuna kırık denir. Organizmada meydana gelen fizyolojik reaksiyonlar, bütünlüğü bozulan

kemiğin yapısal özelliklerini tekrar kazanmasını hedefler. Kemik,diğer dokular gibi skar dokusu oluşturmaz ve kendini yeniden yapılandırarak iyileşir.Yumuşak dokudan farklı olarak,kemikte osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri ile özelleşmiş kalsifiye kemik dokusu rol oynar.Kırık iyileşmesi,defektin meydana geldiği an başlar ve kırık uçları birleşinceye kadar süregelir.Bugüne kadar tam olarak aydınlatılmamış iki şekilde incelenir:

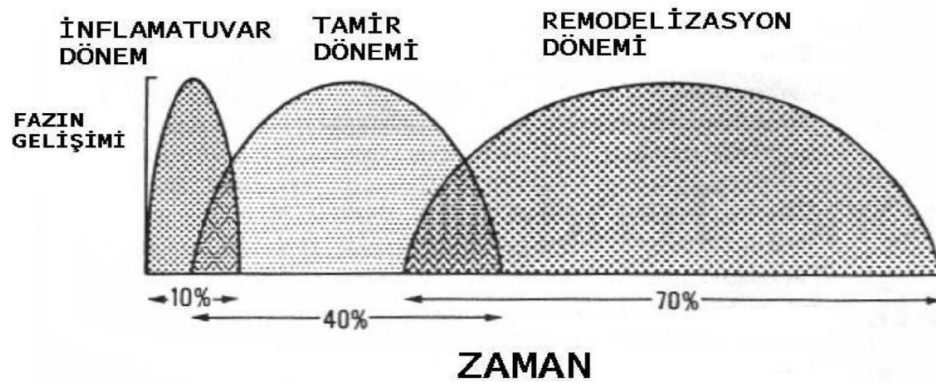
- 1- Primer kırık iyileşmesi
- 2- Sekonder kırık iyileşmesi

2.2.3.1. Primer Kırık İyileşmesi

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

2.2.3.2. Sekonder Kemik İyileşmesi

İndirek kemik iyileşmesi veya periosteal-endosteal kallus ile non-steonal iyileşme olarak ta isimlendirilebilir. Sekonder kemik iyileşmesini 3 evrede izleyebilmek mümkündür. Bunlar; inflamatuvar dönemi, tamir dönemi ve remodelizasyon dönemidir. Şekil 2.2’de kemik iyileşmesi dönemleri gösterilmiştir.



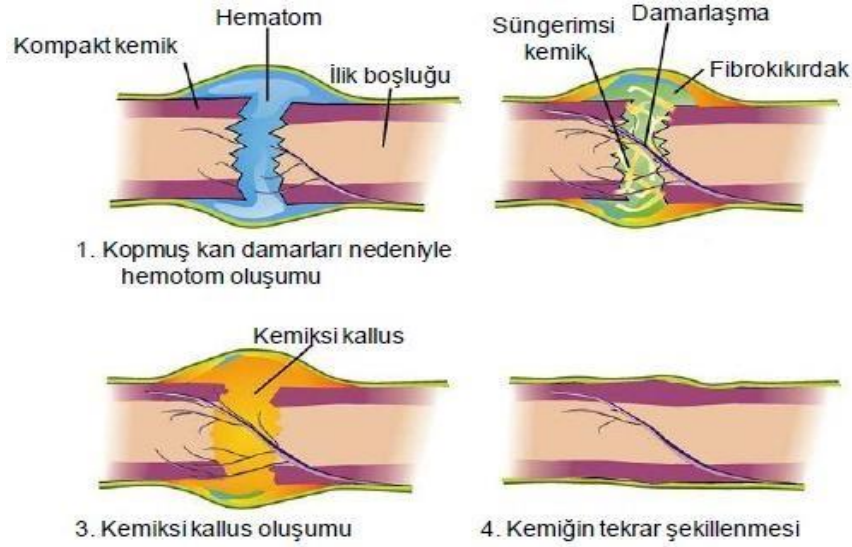
Şekil 2.2. Kırık iyileşmesi dönemleri

İnflamatuvar Dönem (1-4 gün): Doku travmalarında olduğu gibi, kırıklarda da dokunun ilk cevabı inflamasyondur. Bu dönem ilk 3-4 günlük süreyi kapsar. Bu evrede hematoma ve hücre ölümü enflamasyonu başlatır. Kırığın etrafına toplanan kan ve lenf sıvısına kırık hematoma denir. Hematom uygulandığı basınçla kırık uçlarını bir arada tutar. Kırık hematoma ortamında bulunan trombositler ve ortamdaki diğer hücreler epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombositlerden üretilmiş büyüme faktörü (PDGF), transforme büyüme faktörü-beta (TGF-B), kemikten türetilmiş büyüme faktörü (BDGF), interleukin-1 (IL-1) gibi proteinleri ortama salarlar. Bu proteinlerin periosteal hücre çoğalması, doku onarımı ve matriks sentezi gibi görevleri vardır.

Onarım (Reperasyon) Dönemi (2-40 gün): Bu evrede nekrotik dokuları rezorbe edilir ve fibroblastların bölgeye göç etmesiyle onarım evresi başlar. Onarım döneminde görev alan hücreler mezenşimal kökenli, çok yönlü gelişim gücüne sahip olan hücrelerdir. Osteoklastlar ölü kemik dokusunu kaldırırken osteoblastlara farklılaşma kemiğe yakın bölgelerde ilk olarak gözlemlenir. Kırık uçlarına yakın bölgelerde dış kallus oluşumu meydana gelir. Bu evre fibröz kallus dönemi olarak adlandırılır. Osteoblastlar kallus içinde kemiğin oluşabileceği matriks ortamını sentezlerler.

Mineralizasyon evresinde ALP kalsiyumu çöktürür. Osteoklastların geri emilimle boşalttığı alanlar osteoblast tarafından sarılarak kemik oluşumu başlatılır. Bu evreden sonra sert kallus oluşumu başlar.

Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi: Bu evre en uzun evredir. Osteoklastik faaliyetle rezorpsiyon devam ederken, osteoblastlar yeni kemik oluşumunu sağlamaktadır. Bir önceki evrede kalsifiye olan kırıkta osteoid dokuyla yer değişir. Kallus endokondral kemik oluşum yoluyla örgü kemik ile yer değiştirir. Örgü kemik ağır ağır rezorbe olur ve lameller kemik ile yer değiştirir. Şekil 2.3'te kemik onarımının aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kemik onarımı

2.2.4. Kemik Belirteçleri

2.2.4.1. Alkalen Fosfataz (ALP)

Alkalen fosfataz bütün hücre tiplerinde bulunabilen hücresel bir proteindir. Bu nedenle kemiğe özgü değildir. ALP'nin bu farklı tipleri bağırsak, plasenta, kemik, karaciğer ve böbrekten köken almaktadır. Bu izoenzimler arasındaki fark yapılarında bulunan siyalik asitin değişik oranlarda bulunmasıdır. ALP substrattaki fosfat gruplarını kaldıran bir hidrolaz enzimi olarak iş görmektedir. Farklı hücre tiplerinin proliferasyonunda görev almaktadır. Birçok çalışma ALP'nin hücresel aktivitenin ve farklılaşmanın erken belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda protein düzeyinin mekanik güç uygulamalarında da yükseldiği gösterilmiştir [39-42].

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

2.2.4.2. Transkripsiyon Faktörleri

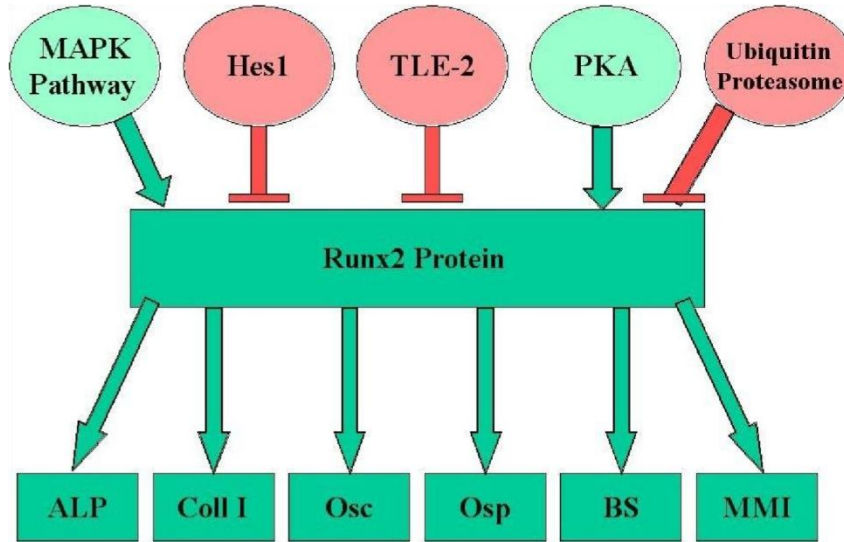
Transkripsiyon faktörleri, DNA'nın üzerindeki şifreyi protein sentezine götürecek yol olan transkripsiyon basamağını, DNA üzerindeki belirli bölgelere

bağlanarak tek başlarına ya da başka proteinlerle birlikte kolaylaştırır veya engelleyen proteinlerdir.

2.2.4.3. Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx 2)

Runx 2 osteoblast fenotiplenmesindeki en önemli gen olarak tanımlanır. Birçok çalışma memeli organizmaların iskelet gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir [43].

Yapılan ilk çalışmalarda Runx 2 nin osteokalsinleri düzenlediği görülmüştür. Fakat son dönemlerde yapılan araştırmalar geniş bir spektrumda osteoblastlara özgü genleri düzenlediği gösterilmiştir. Runx 2 transkripti birçok osteogenik sinyal yolağını etkileyebilmektedir. Bu yeteneği sayesinde osteokalsin, osteopontin, kollojen 1, kollojen 3 (matriks metalloproteinaz 1), kemik siyaloproteini, alkaline fosfotaz TGFB reseptör 1, RANKL (nükleer faktör kapa b ligandı reseptör aktivatörü) gibi genleri direkt uyarabilmektedir (Şekil 2.4) [44-47].



Şekil 2.4. Runx2'nin regülasyonu ve etkilediği yollar

Up regülatör etkiye sahip olanlar yeşille gösterilirken, inhibitör etkiye sahip olanlar kırmızı ile gösterilmiştir

2.2.4.4. Matriks Proteinleri

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

2.2.4.5. Kemik Siyaloproteini (BSP)

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

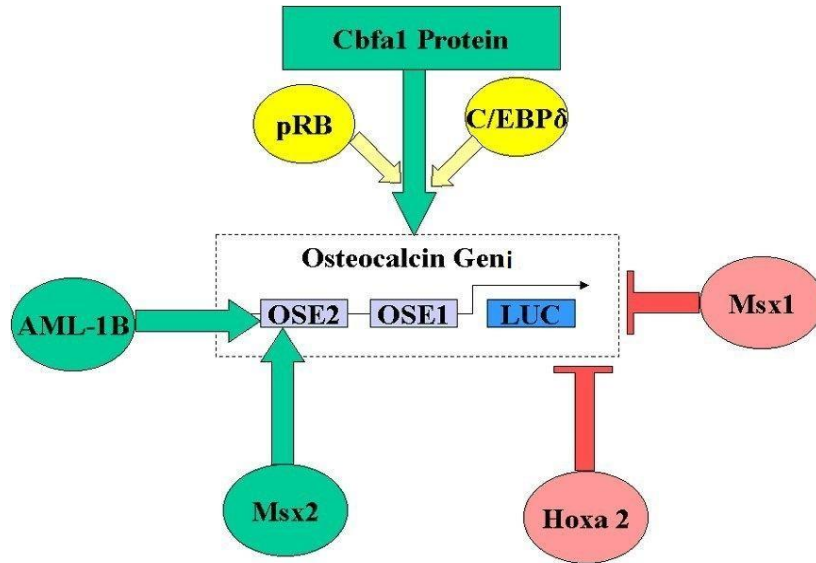
2.2.4.6. Kollajen 1 (COL1)

Tip I kollajen, kollajenin öncül formudur. Hücre yüzeyindeki sitokinlerle diğer ekstrasellüler matriks proteinleri arasındaki bağlantıları biçimlendirirler. Deri, diş, kornea, damarlar ve tendonlar gibi birçok hücre tipinde tayin edildiği için kemiğe özgü olarak kabul edilmez. Bu protein hücre adezyonunda, proliferasyonunda ve osteoblastların fenotiplerinin farklılaşmasında görev alır. Kollajen I'in ifadenmesinin mekanik güç uygulamalarından 2 gün sonra arttığını gösteren çalışmalar vardır [48, 49]. Bu nedenle osteoblastik farklılaşmada erken belirteç olarak görev aldığı gözlemlenmiştir. Osteoblastların tip I kollajen sentezinde amino (-N) ve karboksi (-C) propeptidleri ekstrasellüler endopeptidazlar tarafından koparılmaktadır. Serum tip I kollajen karboksiterminal propeptid (PICP) ve aminoterminal propeptid (PINP) düzeyleri, kemikte osteoblastlar ve bağ dokusundaki fibroblastlarda sentezlenen yeni kollajen sentezindeki değişiklikleri gösterir [50, 51].

2.2.4.7. Osteokalsin [OC (Kemik gla Proteini)]

Kemik gla proteini olarak da bilinen osteokalsin kemiğe özgü nadir proteinlerden biridir [52]. 48 aminoasitten oluşur ve 5.8 kDa ağırlığındadır. Hidroksiapatit bağlama yeteneğindedir. OC'nin başlıca özelliklerinden biri vitamin-K bağımlı, gamma karboksiglutamik asit (Gla) kısımlarının kalsiyum bağlamasıdır. Kemiğin non-kollajen kısmının bir elamanıdır. Osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilirler [53, 54]. Osteoblast progenitör hücrelerin farklılaşmasında, kemiğin biçimlenme aşamasında matriks sentezi ve mineralizasyonunda büyük rol oynarlar [55]. Bu gen birçok hücre içi faktör ve çeşitli reseptör bağlanma bölgeleri sayesinde de farklı hormonlar tarafından düzenlenir [56]. Genin yüksek düzeylerde ifadenmesi Runx2 proteini tarafından düzenlenir.

OC'nin regülasyonu Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. OC'nin regülasyonu

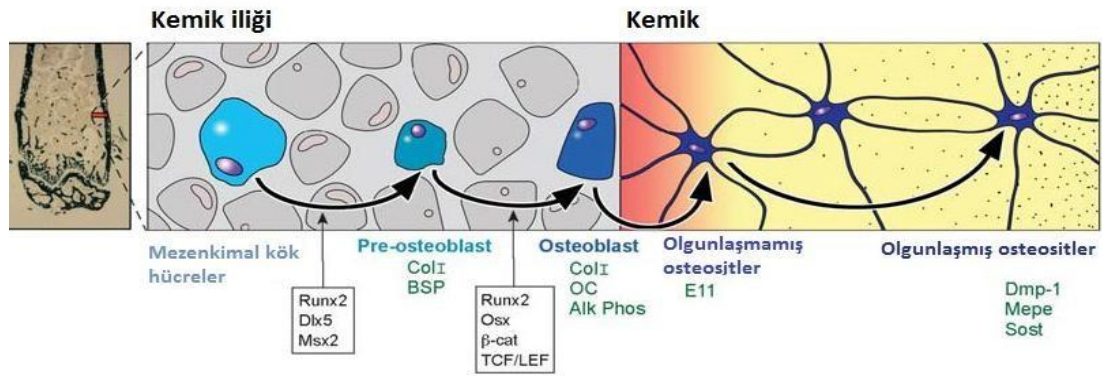
Up regülatör etkiye sahip olanlar yeşille gösterilirken, inhibitör etkiye sahip olanlar kırmızı ile, bağlanan partner proteinler sarı ile gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, OC'nin kemik formasyonu sırasında sentezlendiğini gösterirken, resorpsiyon aşamasında yıkıldığını göstermiştir. Bu sebeple OC'nin

kemik matriks metabolizmasını yoksa kemik döngüsünün mü belirleyicisi olduğu tam olarak açık değildir [57].

2.2.4.8. Osteonektin (SPARC)

SPARC (Osteonektin, BM-40) 32kD ağırlığında, asidik ve sisteince zengin glikoprotein yapısında kalsiyum bağlayan bir matriks proteinidir. Bu proteinler ECM'in yapısal elemanları olarak iş görmekten çok hücre-matriks iletişimini sağlarlar [58]. Ekstrasellüler matrikse destek sağlayan hidroksiapatite ve katyonlara yüksek ilgisi vardır [59]. SPARC kemik formasyonu ve resorpsiyonu arasında bir denge sağlar. Şekil 2.6'da yeni kemik oluşumu süresince rol oynayan moleküler düzenleyiciler gösterilmiştir.

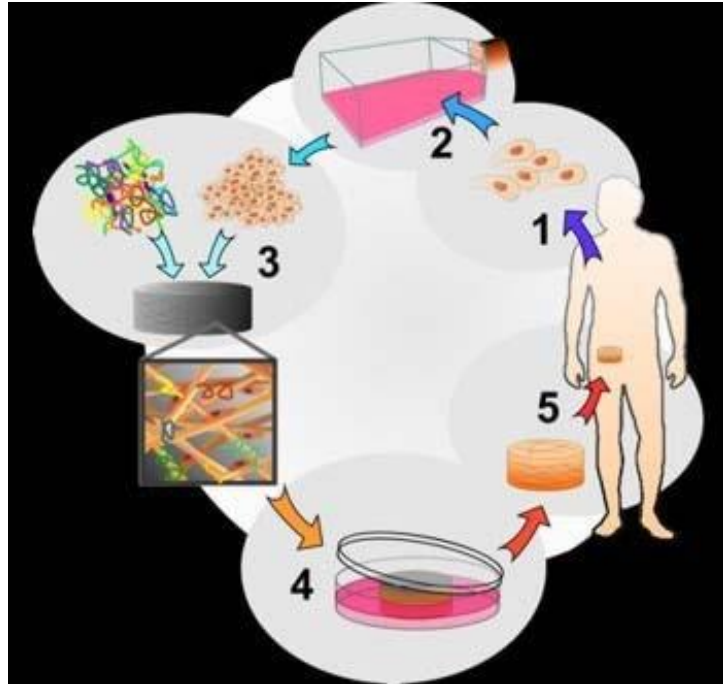


Şekil 2.6. Kemik oluşumunun moleküler düzenleyicileri [60]

2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kalp, karaciğer ya da böbrek gibi organların nakli, diğer türlü iyileştirilemeyen son aşamadaki hastalıklar için oldukça başarılı bir terapidir. Bununla birlikte, verici organlarına olan ihtiyaç bu arzın çok üzerindedir. A.B.D.'de her yıl karaciğer ya da kalp nakli için potansiyel adayların yaklaşık olarak %15'i bekleme sırasında hayatlarını kaybetmektedir. Bu organ eksikliği, hayattaki ilgili vericilerden tüm organın ya da organın bir kısmının bir hastaya nakli gibi cerrahi tekniklerin geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu nakil teknikleriyle alınan mükemmel sonuçlara rağmen vericide oluşturulan hasar bir problem olarak kalmaya devam

etmektedir. Zenotransplantasyon kaynaklar olarak adlandırılan diğer türler (örneğin domuz) gibi alternatif verici kaynaklarının uzun dönemde uygun hale gelip gelemeyeceği spekülatiftir [61]. İmmünolojik bariyerin ötesinde, domuz endojen retrovirüsü (PERV) gibi potansiyel mikrobiyolojik tehlikeler de bulunmaktadır [62]. Doku mühendisliği otolog hücrelerin kullanılması sayesinde ret (hiper akut ya da gecikmiş) gibi immünolojik cevapların ve viral enfeksiyonların ortaya çıkma riskini tamamen ortadan kaldırır (şekil 2.7).



Şekil 2.7. Doku mühendisliğinin temel konsepti

1) Hücrelerin alınması, 2) Hücre kültüründe sayılarının çoğaltılması, 3) Uygun büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte uygun bir skafold içerisine ekim, 4) Kültür ortamına koyma, 5) İşlenmiş dokunun hasar gören bölgeye yeniden implantasyonu

Doku mühendisliğinin temel konsepti ekilen hücrelerin organize olabildikleri ve istenilen organ ya da dokuya implantasyon öncesinde dönüşebildikleri bir yapı sağlayan bir yapı iskelesi (skafold) içerir. Skafold, değiştirilecek doku için hücreler yeterli ekstraselüler matriksi oluşturana kadar bir biyomekanik profil sağlarlar. Yeni oluşturulan matriksin oluşturulması ve organizasyonu sırasında skafold ya degrade ya da metabolize olarak sonunda kendi yerini doku fonksiyonunu restore eden, koruyan ya da iyileştiren bir yaşayan organ ya da dokuya bırakır. Kavramın daha iyi

anlaşılması için, doku mühendisliği (*in vitro* olarak hücre ekilmiş matrikslerin implantasyonu) ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (implantasyon sonrasında konak tarafından içerisi hücrelerle doldurulacak olan, hücre içermeyen matrikslerin kullanılması yaklaşımı) arasındaki ayrımın yapılması yardımcı olacaktır [63]. Vasküler protez (Dacron™) gibi geni bir yüzey alan üzerine komşu dokudan alınan otolog hücrelerin ekilmesinin hayvanlarda işe yararken, insanlarda sınırlı bir kullanıma sahip olduğu gösterilmiştir [64]. Hücre içermeyen ve ekim yapılmamış olan matrikslerin içerisinde gözlenen otolog popülasyon oluşumunun insanlar için kullanılıp kullanılmayacağı tartışmalıdır [65]. Doku mühendisliğinin ilk örnekleri arasında 1933 yılında Bisceglie'nin bir polimer membran içerisine yerleştirilmiş fare tümör hücrelerini tavuk embriyolarının abdominal boşluğuna yerleştirilmesi ve bu hücrelerin yaşamaya devam ettiğini göstermesi verilebilir [66]. 1990'lı yıllarda doku mühendisliğinde büyük gelişmeler olmuş ve şu ana kadar aktif araştırma kapsamından çıkarılan bir doku ya da organ olmamıştır. Bununla birlikte eklem hasarlarının tamiri için aralarında deri ve kıkırdağın olduğu yalnızca birkaç ürün klinik denemelere alınmıştır. Doku mühendisliğindeki en büyük engellerden biri, iyi bir besin maddesi sağlama ve atık uzaklaştırma mekanizmasının oturtulmasıdır. Her ne kadar kalp kapakçığı gibi bazı dokular kendileri için gereken besleyici öğeleri difüzyon yoluyla tedarik etseler de, dokuların ve organların büyük çoğunluğu *vasa vasorum* olarak da bilinen karmaşık bir mikro-vasküler sisteme bağlıdır. Doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılan skafold yapılarının bu soruna da değinecek şekilde tasarlanmaları ve yapılandırılmaları gerekmektedir.

2.4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

2.4.1. Tarihçe

1985 yılında Ulusal Bilim Konseyi'nin toplantısında UCSD (University of California San Diego) den Y.C.Fung tarafından "Doku Mühendisliği" terimi ilk olarak ortaya atılmıştır (m17). Buna rağmen birçokları tarafından Langer ve Vacanti Science dergisinde 1993 yıllarında yayınlanan biyolojik olarak uyumlu sentetik doku iskelesi yardımıyla *in vitro* ortamda canlı hücre elde ettikleri çalışmalarını nedeniyle doku mühendisliğinin "babaları" olarak nitelendirilirler. Bu makalede doku

mühendisliğini “biyoloji ve mühendislik prensipleri ile doku ve organ fonksiyonlarının restorasyonu, idamesi ve geliştirilmesi amacıyla biyolojik eşlenik geliştiren interdisipliner alan” olarak nitelendirmektedirler [67].

Doku mühendisliği ile elde edilen ilk implant kondrosit entegre edilmiş sentetik bir doku iskelesi olup 1991 yılında Poland Sendromu’na sekonder konjenital sternum agenezisi olan 12 yaşındaki bir erkek hastaya uygulanmıştır [68].

Kemik doku mühendisliği için en kritik gelişmelerden biri Urist tarafından 1965 yılında kemik morfojenik protein (BMP) nin bulunması ve popularize edilmesidir [69]. Kemik doku oluşumunu tetikleyen ve düzenleyen bir maddenin keşfi heyecan uyandırmış ve bu maddenin Wozney ve ark. Tarafından klonlanması ile in vivo uygulanabilir olması kemik araştırmalarına ciddi bir ivme kazandırmıştır [1].

BMP ailesinin keşfedilmesinden sonra kemik iyileşmesini hızlandırıcı etkisi olabilecek vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1ve 2 (IGF 1-2), asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörü ile araştırmalar gerçekleştirilmiştir [70-72].

Diğer bir taraftan doku iskelesi amacıyla kullanılan materyaller bakımından da gelişmeler devam etmiş ve günümüzde trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit, polilaktik asit, polilaktik asit ko-glikolik asit ve bileşenleri sıklıkla kullanılmaktadır [8].

Scnell ve ark. 2007 yılında yayınlanan çalışmalarında polikoprolakton ve kollojen/polikoprolakton monofiberler yoluyla sinir dokusunda aksonal uzama ve sinir dokusu üretimi ortaya koymuşlardır [9].

Macchiarini ve ark. 2008 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada kadavradan alınan trakeayı aselüler hale getirdikten sonra alıcı hastanın kök hücrelerinden türetilen hücreleri yükleyerek in vitro ortamda elde edilen dokuyu alıcı hastaya transplante etmişlerdir. Bu klinik deneyim bilinen en önemli doku mühendisliği ile elde edilen organ naklidir. Rejeneratif tıbbın temel alanlarından olan doku mühendisliği, kök hücre biyolojisi ve transplantasyon cerrahisinin bir arada uygulanması açısından oldukça önemlidir [73].

2.4.2. Doku İskelesinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku iskelelerinin sentezinin temel amacı in vivo ortamda hedeflenen dokunun oluşmasını sağlamak olduğu için kimyasal içeriği ne olursa olsun sağlıklı in vivo davranış için belirli bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan polimer:

1-*Osteoindüksiyon* - Doku iskelesine yüklenen kök hücreye veya mikroçevrede yer alan donör hücrelerine toksik olmamalı hatta hedeflenen bu multipotent kök hücreleri ve çevredeki endojen dokuları osteojenik seride çoğalmaları yönünde uyarması ve tetiklemesidir.

2. *Osteointegrasyon* - Kimyasal olarak alıcı dokuya tutunabilmelidir. Biyolojik olarak inert olmalı ve alıcı dokuda herhangi immunojenik yanıt oluşturmamalıdır. Olası immunojenik yanıt rejenerasyon mekanizmalarını inhibe edecektir.

3. *Osteokondüksiyon* - Kullanılan kimyasal malzeme uygulanan dokuda yeni kemik oluşumunu desteklemelidir. Uygun mekanik dirence sahip olmalıdır.

4. İdeal bozunma kinetiğine sahip olmalıdır. Uygulanan anatomik bölgenin ihtiyaçlarını karşılamalı ve arzu edilen mekanik dirence ve yük taşıma kapasitesine sahip olmalı ancak öte yandan hedef dokuda kemikleşme gerçekleşirken osteojenik matürasyona izin verecek şekilde biyobozunur olmalıdır [74-77].

Bu kriterleri belli ölçüde karşılayan ve doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler:

1-Doğal polimer yapıda doku iskeleleri (kollojen, hyaluronik asit, kalsiyum aljinat, kitosan ve fibrin)

2-Mineral bazlı doku iskeleleri (kalsiyum fosfat, seramik, biyoaktif cam)

3-Sentetik polimer yapıda doku iskeleleri (polilaktik asit, poliglikolik asit, polilaktik ko-glikolik asit, polidaksanon, polikaprolakton)

4-Hidrojel yapıda doku iskeleleri (örn.Peptit hidrojel)

olarak gruplanabilir [77-79].

Bu malzemelerden doğal ve mineral bazlı olan doku iskelelerinin osteoindüksiyon kapasiteleri yüksek olmasına karşın kırılğan olmaları, mekanik olarak yük taşıma kapasitelerinin düşük olması nedeniyle klinik olarak hedeflenen geniş kemik defektlerine uygulanması uygun gözükmemektedir.

Buna karşın sentetik polimer yapıda doku iskeleleri ise kemiğin yerine geçebilecek gerekli mekanik, yük taşımaya yönelik özelliklere sahipken osteoindüksiyon gücü diğer malzemeler kadar fazla değildir.

İdeal bir doku iskelesinde bulunması gereken yukarıdaki belirtilen bütün özellikleri tek başına bulunduran tek bir ideal polimer bulunmamaktadır. Bununla beraber sıklıkla gerçekleştirilmeye çalışılan uygulamalardan biride maksimum osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon elde edilmesi amacıyla doğal, mineral bazlı polimerlerle sentetik polimerlerin hibridizasyonu ile kompozit materyal kullanımındır [80].

Bu tez çalışmasında kullanılan doku iskelesi olan B-Trikalsiyum fosfat sert doku onarımında kullanılabilir bir polimerdir, yine bu polimerlerin hidrofobik olduğu bilindiğinden, biyomimetik yaklaşımla hazırlanan bu yapıların tüm gözenek yüzeyleri tip-I kolojen ile kaplanarak hücre tutunmasına uygun hale getirilerek geliştirilmiştir.

2.4.3. Doku İskeleleri Hazırlama Teknikleri

Doku iskelesi üretimindeki en büyük sorun, istenen makro-yapısal (geometri, bileşim, mekanik dayanım, yoğunluk, gözeneklilik), mikro-yapısal (gözenek boyu, gözenekler arası bağlantılar, bozunma davranışı) ve nano-yapısal (yüzey topografisi, yüzeyin fiziksel-kimyasal yapısı) özelliklerin kesin bir şekilde korunmasıdır. İdeal olarak, fabrikasyon tekniğinin aynı zamanda farklı temel malzemelerin kullanımına izin vermesi gerekir. Farklı malzemelerden oluşan karmaşık doku iskelesi tasarımı da üretimde diğer basamakları zorunlu kılar. Çeşitli mühendislik parametreleriyle doku iskelesi üretiminin sonucu belirlenebilir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, uygulanacak doku iskelesi üretim tekniği birincil olarak kullanılan malzemeye göre belirlenir. Doğal olarak bulunan, organik

olmayan malzemeler örneğin sentetik organik malzemeler için kullanılan tekniklerden farklı şekilde ve doğal olarak bulunan organik olmayan malzemeler de sentetik organik malzemeler için kullanılanların dışında farklı tekniklerle üretilir. Organik olmayan malzemelerin üretimi genelde seramik teknolojisinde kullanılan tekniklerle yapılırken, sentetik ve doğal (organik) polimer malzemelerinin işlenmesi için çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Geleneksel polimer işleme teknikleri, yığın ya da gözenekli yapıya sahip skafoldların oluşturulmasında kullanılan süreçler olarak tanımlanabilir. Bunun aksine, katıların kullanılmadığı üretim tekniklerinde, doğrudan bilgisayarda oluşturulmuş modellerden tabakalar halinde skafold üretimi yapılmakta, bu sayede yapılara gözenekler/boşluklar katılabilmektedir.

Yaygın olarak kullanılan teknikler çözücü döküm/partikül ekstraksiyonu, faz dönüşümü/partikül ekstraksiyonu, fiber çekme/bağlama, eriterek kalıplama, gazla köpüklendirme/yüksek basınç muamelesi, membran laminasyonu, hidrokarbon kalıplama, dondurarak kurutma, emülsiyondan dondurarak kurutma, çözelti döküm ve bu tekniklerin kombinasyonlardır. Bu tekniklerin temelleri ve prosedürleri çeşitli incelemelerde bulunabilir [81-83]. Çok sayıda skafold kemik ve kırık dokü mühendisliğinde *ex vivo* kullanılmış ve hayvan deneylerinde ve klinik durumlarda incelenmiştir. Çalışmada kullanılan işlemlerin avantajlarını ve kısıtlamalarını anlamak için, bu yöntemlerden aşağıda kısaca bahsedilmiştir. Tablo 2.1’de skafold üretim yöntemleri verilmiştir.

Çözücü döküm/partikül ekstraksiyonu, doku mühendisliği skafoldlarının hazırlanmasında yaygın şekilde kullanılan ve kapsamlı şekilde incelenmiş bir üretim yöntemidir. Bu şekilde üretilmiş skafoldlar, kemik ve kırık dokü mühendisliği uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmışlardır [84]. Mikos tarafından 1994’te ilk kez tarif edilen bu yöntem bir mineral ya da organik partikülün polimer çözeltisi içerisinde disperse edilmesine dayanır. Dispersiyon sürecinin ardından bir döküm ya da dondurarak kurutma süreci gelir. Bu temel süreç modifiye edilerek iyileştirilmiştir [85, 86].

Çözücü döküm/partikül ekstraksiyon tekniği özellikle poli (L-laktik asit) (PLLA) skafoldlarının üretiminde kullanılmış olsa da, diğer polimerler için de uygulanmıştır [87]. Bu yaklaşımın kullanımı görece kolay olmasına rağmen,

yöntemin, toksik çözücülerin kullanılıyor olması ve ince yapıların hazırlanmasında kısıtlama getirmesi gibi dezavantajları vardır [88].

Tablo 2.1. Doku iskelesi fabrikasyon teknikleri

Geleneksel	Hızlı Prototipleme
<p><i>Çözücü döküm/partikül ekstraksiyonu</i> <i>Faz dönüşümü/partikül ekstraksiyonu</i> <i>Fiber çekme/bağlama</i> <i>Eriyikten kalıplama</i> <i>Gazla köpüklendirme</i> <i>Süperkritik akkan muamelesi</i> <i>Membran laminasyon</i> <i>Hidrokarbon kalıplama</i> <i>Elektrosipining</i> <i>Dondurarak kurutma</i> <i>Emülsiyondan dondurarak kurutma</i> <i>Çözelti döküm</i></p>	<p><i>Birleşik depozisyon modelleme</i> <i>Üç boyutlu baskılama</i> <i>Üç boyutlu işaretleme</i> <i>Seçici lazer sinterleme</i> <i>Lamine edilmiş şekilde üretim</i> <i>Steriolitografi</i> <i>Çok fazlı jetten katılaştırma</i></p>

Yüksek basınç altında gaz kullanılarak yapılan köpüklendirme de polimer disklerinin CO₂ ile doyurulmasına dayanan bir diğer işleme tekniğidir. Bu yöntemin bir avantajı, oldukça yüksek gözeneklilikte polimerler elde ederken, 100 µm boyutlarında gözenek aralığına ulaşılabilmesidir [89]. Bu teknikte üretilen skafoldların ise düşük mekanik özellik ve iyi tanımlanamayan gözeneklilik gibi dezavantajlar vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney hayvanlarının tüm cerrahi işlemleri, bakımları ve izlemleri bu laboratuvarında yapıldı. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan gerekli izin alındı (Karar No:2013/70-08).

Çalışmada toplam 64 adet 350-500 gr ağırlığında, erkek Wistar-albino sıçanlar kullanıldı. Kullanılan deney modeli literatürde tariflenmiş alveoler yarık kritik boyutlu defekt modeli baz alınarak planlanmıştır. Tüm hayvanlar, standart çevresel koşullar sağlanacak şekilde, oda sıcaklığında, her bir kafeste birer sıçan olacak şekilde barındırıldı. İşlem öncesi değerlendirmede deneye dahil edilen hayvanların hiçbirinde enfeksiyon, açık yara, malnütrisyon veya başka bir sağlık bozukluğu yoktu. Beslenmelerinde standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanıldı. Çalışma yapılacak sıçanlara, çalışmadan 6 saat önce, sıvı ve yiyecek kısıtlaması yapıldı. Profilaktik antibiyoterapi uygulanmadı.

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN DOKU İSKELELERİ MODELLERİ

Çalışmada kullanılan doku iskeleleri modelleri ve üretim tekniği Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Bölümü Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı'nda tanımlanmış olup bu çalışmada kullanılan doku iskelelerinin üretim ve karakterizasyonu da aynı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

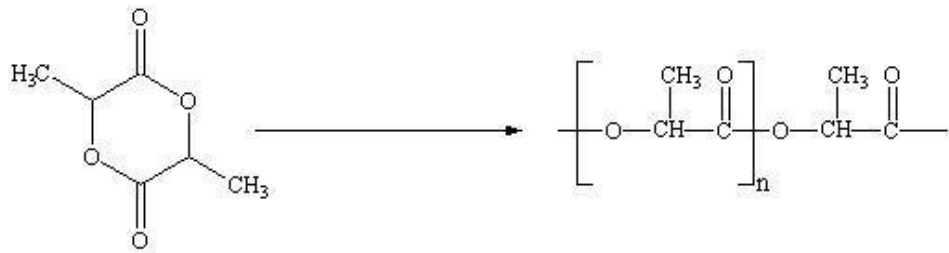
3.1.1. Poli (L-laktat)/Poli (ϵ -Kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi ve Polimerik Blendlerin / Doku İskelerinin Hazırlanması

3.1.1.1. Poli (L-laktat)/Poli (ϵ -kaprolakton) Polimerlerin Sentezlenmesi

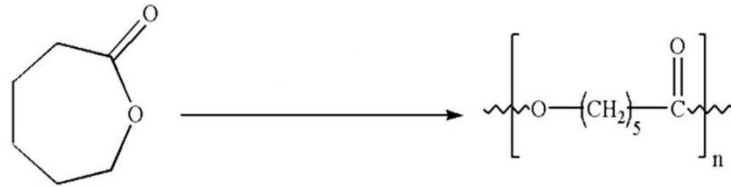
Çalışmanın polimer sentezi basamağında Halil Murat Aydın'ın Hacettepe

Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalında optimize ettiği koşullar altında sırasıyla L-laktat (LLA) (Purac, Hollanda) dimeri, ϵ -kaprolakton (ϵ -CL)

(Aldrich, Almanya) monomeri ve kalay oktoat (SnOc) (Sigma, ABD) ise katalizör olarak kullanılmıştır. Aynı koşullar altında laktat dimeri ve ϵ -kaprolakton monomerinin yığın polimerizasyonu yöntemi ile ayrı ayrı polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan LLA dimeri susuz toluen içerisinde çözülmüş ve yeniden kristallendirilerek saflaştırılıp kullanılmıştır. ϵ -kaprolakton monomeri, kullanılan tüm çözücüler ve katalizör hiçbir işlem uygulanmadan kullanılmıştır. Polimerizasyon reaktörü olarak cam balon kullanılmıştır. Polimerizasyon bu reaktörde vakum altında, etüvde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1 ve 3.2’de sırasıyla PLLA ve PCL polimerizasyon reaksiyonları görülmektedir [90].



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



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

Polimerizasyon basamağında izlenen yol şöyledir: Seçilen LLA veya ϵ -CL ve monomer-katalizör oranına göre miktarları hesaplanan katalizör polimerizasyon reaktörüne konur. Katalizör susuz toluende çözümlenerek eklenir. Daha sonra oda sıcaklığında toluenin tamamı vakum varlığında uzaklaştırılır, reaktöre bir süre azot verilir ve ağzı kapatılarak polimerizasyon sıcaklığına getirilmiş etüve alınır ve reaksiyon başlatılır. Katalizörün homojen bir şekilde karışmasını sağlamak amacıyla ilk bir-iki saat reaktör çalkalanır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaktör etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında soğutulur. Balonun ağzı açılır, polimer susuz

kloroformda çözülür ve soğuk metanolde çöktürülür. Elde edilen polimer vakum altında etüvde kurutulur, 4°C'de muhafaza edilir. Polimerizasyon sıcaklığı PLLA ve PCL polimerleri için 120°C'dir. PLLA için polimerizasyon süresi 30 saat seçilirken, PCL için 4 saat seçilmiştir [90].

3.1.1.2. Polimerik Blendlerin Hazırlanması

Bozunma davranışını ve mekanik özellikleri daha iyi şekilde kontrol edebilmek ve amaca uygun en iyi PLLA/PCL karışımının belirlenmesi için, yukarıda anlatılan şekilde sentezlenen iki farklı molekül ağırlığına sahip iki polimer kullanılarak blendler hazırlanmıştır. Blend içerisinde bulunan düşük molekül ağırlığına sahip PCL'nin düşük molekül ağırlığından dolayı önce bozunması ve *in vivo* olarak hücre proliferasyonu için daha fazla yer sunması, yapıya esneklik kazandırılması düşünülürken, görece olarak daha yüksek molekül ağırlığındaki PLLA fraksiyonu oldukça yüksek gözenekliliğe (yaklaşık %90) sahip skafoldların yapısal bütünlüğünün korunması için yapıya dâhil edilmiştir. Blendler basitçe, elde edilen polimerlerin daha önceden belirlenmiş ağırlıklarda ayrı ayrı tekrar kloroform içerisinde çözünmesi (%15 a/h) ve mekanik karıştırma altında, bu polimer çözeltilerinin oldukça etkin bir şekilde birbirleriyle karıştırılması, son olarak da soğuk bir çöktürme ortamında (metanol) çöktürülüp, kurutulmaları ile elde edilmiştir. 3 farklı PLLA/PCL blend oranı kullanılmıştır: %25 PLLA + %75 PCL

(Blend A), %50 PLLA + %50 PCL (Blend B) ve son olarak %75 PLLA + %25 PCL

(Blend C). Farklı 3 blend oranı kullanılarak hazırlanan doku iskeleleri ile yapılan 6 aylık *in vitro* bozunma deneyi ve mekanik testlerin sonunda %50 PLLA + %50 PCL blendi daha sonraki çalışmalar için gerek mekanik özellikleri, gerekse bozunma davranışı açısından uygun bulunmuştur [90].

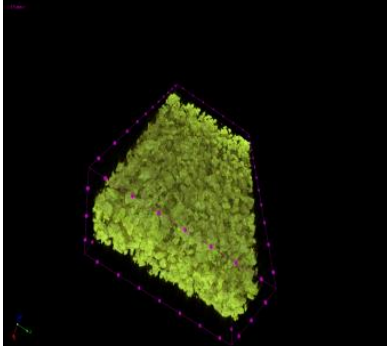
3.1.1.3. Poli (L-laktat)/Poli (ϵ -kaprolakton) Doku İskelelerinin Hazırlanması

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

2000 psi, Sıcaklık: 35 °C ve muamele süresi: 10 dakika [90].

3.2. B-TCP-KOLLOJEN

Kollajen/beta-trikalsiyum fosfat bileşik greft'i EDQM (İlaç Kalite Avrupa Müdürlüğü) tarafından onaylı sığır kökenli kolajen Tıp-I ile asetik asit içinde ticari olarak temin edilebilen beta-trikalsiyum fosfat partiküller'i (BMT Calsis Co, Turkey) özel şartlarda hazırlanıp karıştırılarak elde edildi. Bu karışım kalıplar içine döküldü ve 48 saat boyunca dondurularak kurutuldu. Yapıları çapraz bağlanması amacıyla, bir in-house (BMT Calsis Co monografi) dehidrotermal tedavisi (DHT) işlem yapılmıştır. Fourier Infrared Spektroskopisi (FTIR), diferansiyel tarama kalorimetri (DSC) ve mikro-bilgisayarlı tomografi kemik greft yapısını ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Kollajen / beta-trikalsiyum fosfat bileşik matrisleri alveoler modeli için istenilen boyutta kesildi ve kullanımdan önce 25 kGy γ -ışınması ile sterilize edilmiştir.



Şekil 3.3. Kollajen/β-TCP doku iskelesinin mikro tomografik görüntüsü

3.3. SKAFOLDLARIN HAZIRLANMASI VE STERİLİZASYON

Hazırlanan skafoldlar, oluşturulacak alveolar defektlere oturacak şekilde (7x4x3 mm) kalınlığında kesilmiştir. Wistar sıçanlarına (n=96) implante edilmeden önce gamma sterilizasyonu için uygun torbalara yerleştirilmiş 20 kGray gama ışınına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir (şekil 3.4).



Şekil 3.4.Çalışmada kullanılan doku iskeleleri

Her bir doku iskelesi defekt alanına uygun şekilde kesilip (7x4x3 mm), solda görüldüğü üzere her bir doku iskelesi steril jelatin filmler ile kaplanmıştır.

3.4. DENEY GRUPLARI

Çalışmada kullanılan sıçanlar her bir grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup farketmeksizin hayvanların damağının bir tarafında alveoler kemiğinde 7x4x3 mm boyutlarında kemik defekti oluşturulmuştur. Erken ve geç dönem

kemikleşme karşılaştırılması amacıyla histolojik ve morfolojik çalışmalar için 1. ve 4. aylarının sonlarında örnekler alınmıştır. Böylece her bir grup için 6 tanesi 1.ay diğer 6 tanesi de 4.ay da olmak üzere toplam 12 örnek elde edilmiş oldu.

Ayrıca gen ifade düzeyi çalışmaları için yukarıda açıklanan her gruptan 4 er denek kullanılmıştır (ek olarak 16 sıçan) ve belirtilen mekanik defektler deneklere aynı şekilde uygulanmıştır.

Birinci grup, kontrol grubu (DEFEKT) olarak belirlendi. Bu grupta deneklerin alveoler bölgelerinde standart 7x4x3 mm lik kritik boyutlu kemik defektleri oluşturuldu ve herhangi bir tedavi edici uygulama gerçekleştirilmeksizin işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla 1.ve4. aylarda hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

İkinci grup (OTOGREFT) olarak belirlendi. Bu grupta deneklerin alveoler bölgelerinde standart 7x4x3 mm lik kritik boyutlu kemik defektleri oluşturulduktan sonra deneklerin iliyak bölgesinden yine defekte uygun olacak şekilde 7x4x3 mm lik otogreftler alınarak defekte yerleştirilip işleme son verildi. Greft alma işlemini standartize etme amacıyla şekil d de görülen 7x4x3 mm lik greft alabilen alet geliştirilmiştir (şekil 3.5.). Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla 1.ve 4. aylarda hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.



Şekil 3.5. 7x4x3 mm lik standart otogreft alabilen alet görülmektedir

Üçüncü grup ϵ -kaprolakton doku iskelesi grubu olarak belirlendi. Bu grupta deneklerin alveoler bölgelerinde standart 7x4x3 mm lik kritik boyutlu kemik

defektleri oluşturulduktan sonra defekt bölgesine daha önce belirtildiği üzere 7x4x3 mm boyutlarında hazırlanmış kaprolakton doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla 1.ve 4. aylarda hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

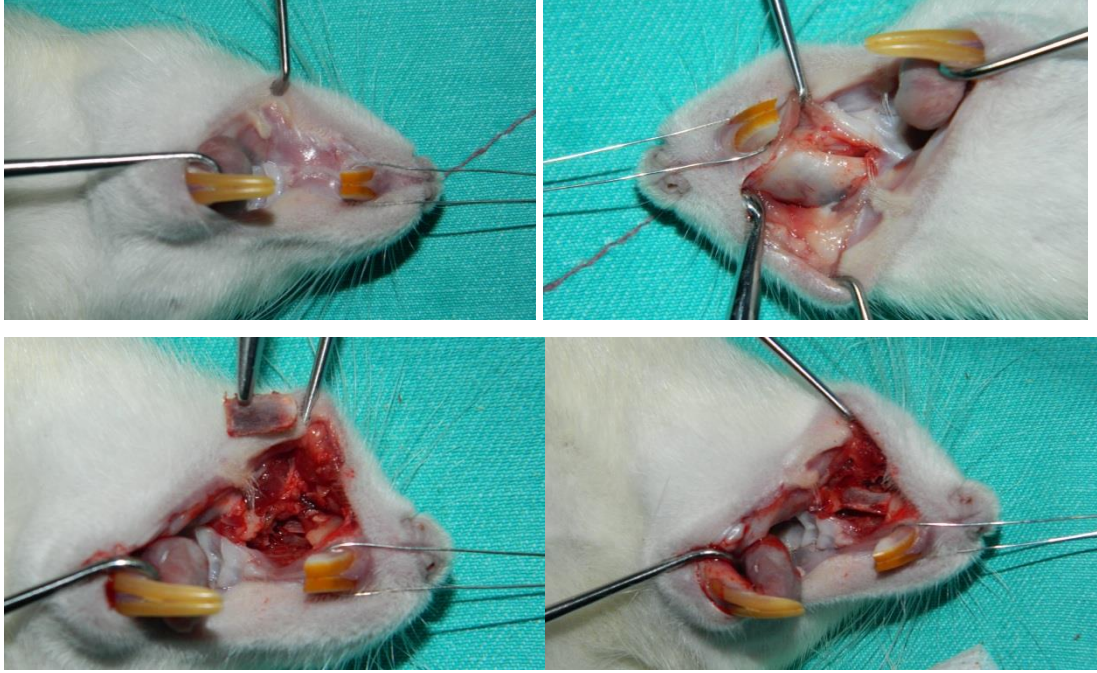
Dördüncü grup Kollajen/ β -TCP doku iskelesi grubu olarak belirlendi. Bu grupta deneklerin alveoler bölgelerinde standart 7x4x3 mm lik kritik boyutlu kemik defektleri oluşturulduktan sonra defekt bölgesine daha önce belirtildiği üzere 7x4x3 mm boyutlarında hazırlanmış doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla 1.ve 4. aylarda hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

3.5. ANESTEZİ

Tüm hayvanlarda anestezi indüksiyonu intraperitoneal ketamin (90mg/kg-Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve ksilazin (10mg/kg-Rompun, Bayer, Türkiye) karışımı ile sağlandı. Anestezi derinliği, cilt veya parmak kısırtma testine ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirildi. Deney devam ederken sıçanın idrar ve dışkı çıkarması veya uyanması durumunda ek doz olarak 10mg/kg ketamin ve 2mg/kg ksilazin verilerek anestezinin devamı sağlandı.

3.6. CERRAHİ İŞLEM

Anestezi indüksiyonunu takiben, grup farketmeksizin sıçanlar supin pozisyona getirilerek ağızları retraktör yardımı ile açılmış, povoidon ile lokal temizlik yapılmış, molar diş ve öndeki kesici diş arası bir cm'lik bölge mukozası bistüri ile tam kat kesilmiştir. Daha sonra dentoalveoler periost disseke edilmiş ve alveoler kemiğe ulaşılmıştır. İnce uçlu bir matkap ile alveoler kemikte yaklaşık 7x4x3 mm boyutlarında kemik defekti oluşturulmuştur. Hemostazı takiben her gruba özgül işlemler gerçekleştirilmiş ve en sonunda insizyon 5.0 veyril sütürler ile kapatılmıştır. Tüm gruplarda bu cerrahi işlem standart olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Cerrahi işlem

Her sıçana standart olarak yapılan 7x4x3 mm lik alveoler defekt oluşturulması, sağ alt resimde ise defektin iliyak bölgeden alınan otogreft ile rekonstrüksiyonu görülmektedir.

3.7. CERRAHİ SONRASI İZLEM

Hayvanlar işlemi takiben kafeslerine alınarak cerrahi sonrası ağrı tedavisi amacıyla içme sularına 2mg/ml parasetamol eklendi. Hayvanlar deney süreci boyunca ad libitum olarak standart yem ile beslendi; günlük olarak, genel durum, vücut ağırlığı, malnutrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden değerlendirildi.

3.8. ÖTENAZİ

Gruplarda deney sürecinin tamamlanmasını takiben deneyde kullanılan hayvanlara yüksek doz anestetik verilerek ötenazi uygulandı.

3.9. MİKRO-BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (μ-CT) İLE RADYOMORFOMETRİK ANALİZ

Tüm mikro tomografi sistemleri çeşitli yollar boyunca seyahat eden X-ışınları ile objenin aydınlatılması ve bu yollar boyunca ışın yoğunluğundaki azalmayı ölçmek için dizayn edilmişlerdir.

Sıkça kullanılan bir konfigürasyonda, taranacak olan obje eş düzlemlerle X-ışınlarının yelpaze ışın demeti içerisinde yerleştirilmektedir. Örnek içerisinde geçen X-ışınlarının atenuasyonları bir dedektör yayı tarafından ölçülmektedir. Atenuasyon ölçümleri objenin farklı açılardan görüntüsünü elde edecek biçimde numunenin bir ekseninde döndürülmesi esnasında yapılır. Bu veriden, X-ışını düzleminde, objenin içerisindeki çizgisel X-ışını atenuasyon katsayısını haritalayan iki boyutlu bir görüntü oluşturulur.

Komşu kesitlerin üst üste kümelenmesi ile 3D (üç boyutlu) görüntü elde edilir. Bu 3D görüntü izo yüzeyleme, hacim oluşturma ve animasyonlarla en iyi şekilde gösterilebilir.

Tez çalışmasında elde edilen örnekler mikro tomografi yöntemiyle taranmak üzere Hacettepe Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'na teslim edildi. Tomografik radyograflar, mikro-bilgisayarlı tomografi cihazı (Skyscan 1174, Belçika) kullanılarak maksiller kesici dişlerin labiyal yüzeyinden zigomatik arka kadar olan bölgeden elde edilmiştir. Elde edilen radyograflar üzerinden Nrecon Software (Skyscan 1174, Belçika) programı ile 21 μm kalınlığında iki boyutlu kesitler alınmıştır. Şekillendirme öncesi ve sonrasında elde edilen mp formatındaki 2 boyutlu kesitler 3D-Doctor (v.3.5 Able Software Corp; Lexington, MA) medikal analiz programına aktarılmıştır. 3D-Doctor volume render ve surface render gibi işlemler deneğin 2 boyutlu kesit görüntülerinde gerçek zamanlı olarak elde eder. Vektör tabanlı çalışan medikal modelleme programıdır. Segmentasyon, kesitlerin her biri için Hounsfield Değerleri'ne göre yapılır. Microct'de her bir vokselde hesaplanan X-ışını zayıflatma değerini standart bir değer ile belirtmek amacıyla Hounsfield skalası olarak adlandırılan bir referans sistemi kullanılmaktadır. Hounsfield skalasında x-ışını atenuasyon değerleri -1000 ve 1000 arasında 2000 birim içerisinde sınıflandırılmıştır. Segmentasyon yapılırken standardizasyon amacı

ile referans noktaları belirlenmiştir. Boundary işlemine tabi tutulan kesitler dekupe edilip, gerekli düzeltmeler yapılmıştır. Elde edilen görüntülerin 3D surface renderingi kalibrasyonu yapılan kesitler üzerinde yapılmıştır. STL formatında kaydedilen görüntüler NURBS (non uniform rotational b spline) temelli Rhinoceros 3D (Robert McNeel & Associates, Seattle, USA) analiz programına aktarılmıştır. 3 boyutlu görüntülerin uzaysal düzlemde orta hattan alınan kesitleri ve bu kesitler üzerinden yapılan analizleri oluşturulan bu stl formatı üzerinden yapılmıştır.

3.10. HİSTOLOJİ VE HİSTOMORFOMETRİ ÇALIŞMALARI

Kemik örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisinde tespit edildikten sonra 1 ve 4 aylık örnekler mikrotomografiye gönderildi. Mikrotomografi sonrası dokular De Castro çözeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) kontrollü olarak dekalsifiye edildi ve sabit vakumlu otomatik bir doku takip cihazı ile izlenerek parafine gömüldü. Üç-beş mikrometre kalınlığındaki kesitler hematoksilen eozin (HE) ve Masson trikrom (MT) ile boyandı. MT ile kompakt kemiğin kırmızı, osteoid ve kırırdağın yeşil, hücre sitoplazmalarının eflatun boyandığı yüksek kontrastlı görüntüler elde edildi. Alveolar defekt alanı, bilgisayar ve dijital kamera (Leica DFC 480, Westlar Almanya) bağlantılı Leica DMR (Westlar Almanya) marka ışık mikroskopunda görüntülendikten sonra defekt alanı en küçük büyütmede saklanıp Qwin plus marka (Leica, Westlar Almanya) görüntü analiz programı ile kantitatif olarak değerlendirildi. Yeni trabeküler kemik alanı total defekt alanına oranlanarak elde edilen piksel ölçümleri mikrometre kareye dönüştürüldü; elde edilen oran yüzde olarak kaydedildi [91, 92].

İstatistiksel analiz: Bağımsız değişkenler gruplar, bağımlı değişkenler histomorfometri, PCR ve mikrotomografi ölçümleridir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı ve varyansların homojenliği Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Tüm veriler parametrik olmayan testlerle Bonferoni düzeltmesi yapılarak (çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için posthoc Mann Whitney U testi) değerlendirildi. Spearman korelasyon testiyle mikrotomografi ve histoloji verilerinin korelasyonu değerlendirildi. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum

değerleriyle temsil edildi. Fark, p 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

3.11. GEN İFADE DÜZEYİ ÇALIŞMALARI

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

3.11.1. Dokudan Total RNA Saflaştırılması

Deney sonunda steril bir şekilde çıkartılan eski cerrahi bölgeden elde edilen doku örnekleri steril petri kabında, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50 mg- 100 mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz ve RNaz free 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. doku örnekleri, total RNA izolasyonunun yapılacağı güne kadar - 80 °C' de saklandı. Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi peqGOLD TriFast™ dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işleminin tüm aşamaları güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

3.11.2. Dokudan RNA İzolasyon Protokolü

- 1- 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokuların üzerine 1000 mikrolitre (µl) TriFast eklendi ve homojenizatör ile parçalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.

- 2- Süre sonunda 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 sn boyunca vorteks yardımıyla karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 3- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), ara faz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 4- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 µl izopropanol eklenip vorteks yardımıyla karıştırıldı.
- 5- Örnekler 1.5 saat -20 °C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı.
- 6- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 µl DNaz (µg başına 5U DNaz), 300 µl DNaz Buffer I ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dk 37 °C'de bekletildi.
- 7- Örneklerin üzerine 300 µl 25mM EDTA eklendi ve 65 °C'de 10 dk bekletildi.
- 8- 13.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan sıvı atıldı.
- 9- 1000 µl %75'lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.500 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan sıvı atıldı.
- 10- Pelet üzerine tekrar 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.500 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan sıvı atıldı.
- 11- Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar - 80 °C' de saklandı.

3.11.3. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen total RNA'ların saflık ve miktar değerleri NanoDrop ND-100 spektrofotometre cihazında 260/280 nanometre (nm) dalga boyunda ölçülerek belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

cDNA sentezi için Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) karışımı ince çepirli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.11.4. RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngü cihazı, Tablo 3.12'de belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi elde edildi.

Tablo 3.2. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılmaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.11.5. Gen ifade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi

Runx2, Osteokalsin (OSC), Osteonektin (SPARC), BSP, Bone Alkalen Fosfataz (ALP) ve Osterix (OSX) genlerinin mRNA ifadesinin kantitatif değerlendirmesi Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL Taqman probu ve LC TaqMan Master karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP ve OSX gen

ifadelenme miktarlarını normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, Beta Actin (ACTB) genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanıldı ve ACTB mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi tablo x'de verilmiştir. Kullanılan proplar Roche Diagnostic'ten temin edilmiştir. Tüm cDNA örnekleri her bir gen için en az ikişer kez çalışılmıştır.

Tablo 3.3. Spesifik Primer Dizileri ve UPL Prob Numaraları

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer	UPL prob no.
Runx2	5'-CCACAGAGCTATTAAGTGACAGTG-3'	5'-AACAAACTAGGTTTAGAGTCATCAAGC-3'	98
OSC	5'-ATAGACTCCGGCGCTACCTC-3'	5'-CCAGGGGATCTGGGTAGG-3'	125
SPARC	5'-TGAGACCTGTGACCTAGACAATG-3'	5'-CCAGATCCTTGTTGATGTCCT-3'	65
BSP	5'-CGGCCACGCTACTTTCTTTA-3'	5'-CGAACTATCGCCATCTCCAT-3'	65
ALP	5'-GCACAACATCAAGGACATCG-3'	5'-TCAGTTCTGTCTTGGGGTACAT-3'	77
OSX	5'-GCTGCCTACTTACCCGTCTG-3'	5'-GTTGCCCACTATTGCCAACT-3'	137
ACTB	5'-CCC GCGAGTACAACCTTCT-3'	5'CGTCATCCATGGCGAACT-3'	17

Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB Genleri için Real-Time PCR Tepkime Karışımı

Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB genlerine uygun verilen primer ve proplar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenler tablo 3.14'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µL
Primer F (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µL
Primer R (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µL
TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µL
LC TaqMan karışımı (10x)	1x	1 µL
cDNA	-	1 µL

3.11.6. Light-Cycler (LC) Deney Programı

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. Kapiller tüpler 3000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra LC cihazında Tablo 3.15'te belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

Tablo 3.5. Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00 dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10 sn	20 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30 sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve ACTB genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri kullanılarak Pfaffl matematiksel metodu ile gruplar arasında mRNA ifade düzeylerindeki değişimler belirlendi. ACTB mRNA düzeyi Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP ve OSX gen ifade düzeylerini normalize etmek amacı ile kullanıldı.

3.11.7. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Gruplar arasında elde edilen doku örneklerinde doza ve zamana bağlı olarak değişen Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP ve OSX mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı [93]. 0.05’den küçük olan p değerleri ($p < 0.05$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MİKRO-BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (μ -CT) İLE RADYOMORFOMETRİK ANALİZ

Hayvan deneyi çalışmalarının sonunda 1 ve 4 aylık sürelerde örnekler operasyon ile hasar bölgesinden çıkartıldıktan sonra histolojik analizlerinden önce tomografik incelemeleri yapılmıştır. Tomografik incelemede amaç, hasarlı bölgede oluşan yeni kemiğin hacim olarak tespitiydi. Bu bölümde her gruptan 7"şer hayvan incelenmiştir. İnceleme sonucunda elde edilen tomografik radyograflardan her gruba ait 2"şer tomografik radyograf Şekil 4.10; 4.11; 4.12; 4.13 te verilmiştir. Yeni oluşan kemik alanının tayini 3D görüntülerin 3D-Doctor (v.3.5 Able Software Corp; Lexington, MA, A.B.D.) medikal analiz programında deneklerin üst çenesi santral dişlerin arasından geçen bir hattan simetrik olarak ikiye bölünerek çenenin operasyon gören sol segmentindeki defekt hacmi ve içindeki kemik doku hacmi hesaplanmıştır. Defekt bölgesinde oluşan yeni kemik hacmi, defekt bölge hacmine oranlanmıştır ve istatistiksel analizi yapılmıştır.

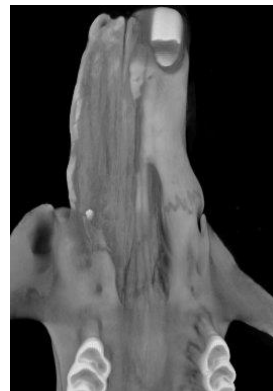
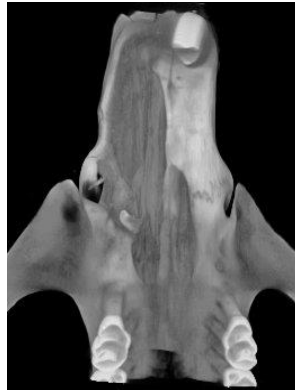
1. ÖRNEK

2. ÖRNEK

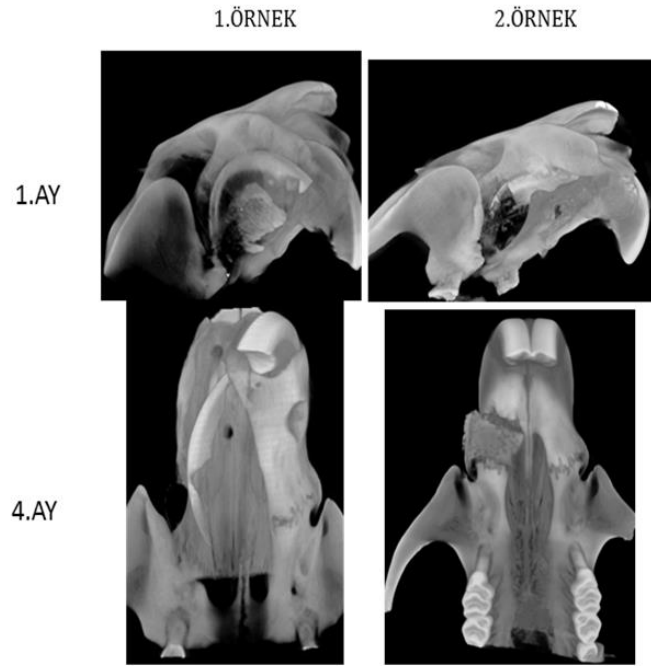
1. AY



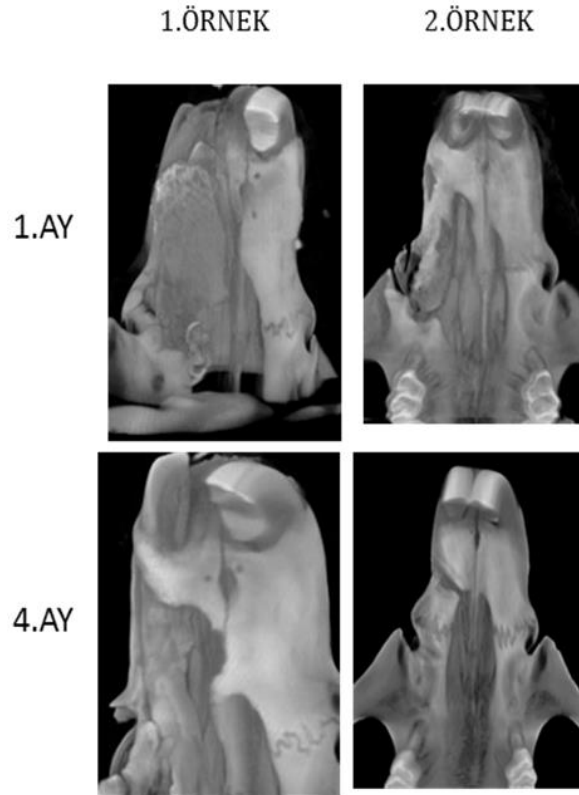
4. AY



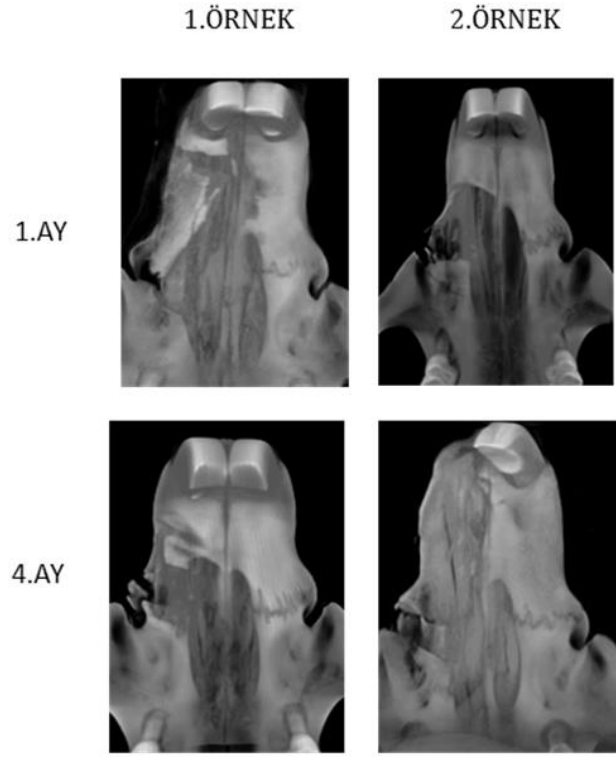
Şekil 4.1. Defekt kontrol grubunun 1. Ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları



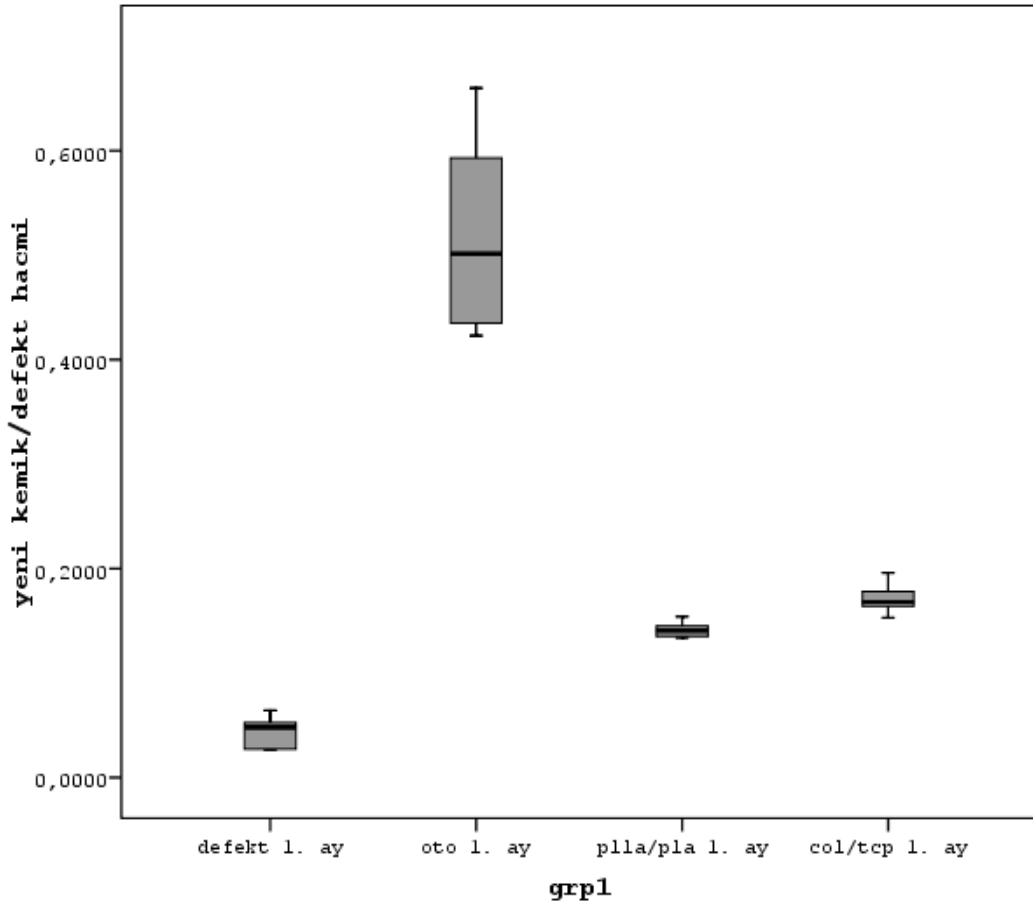
Şekil 4.2. Otogreft grubunun 1. Ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları



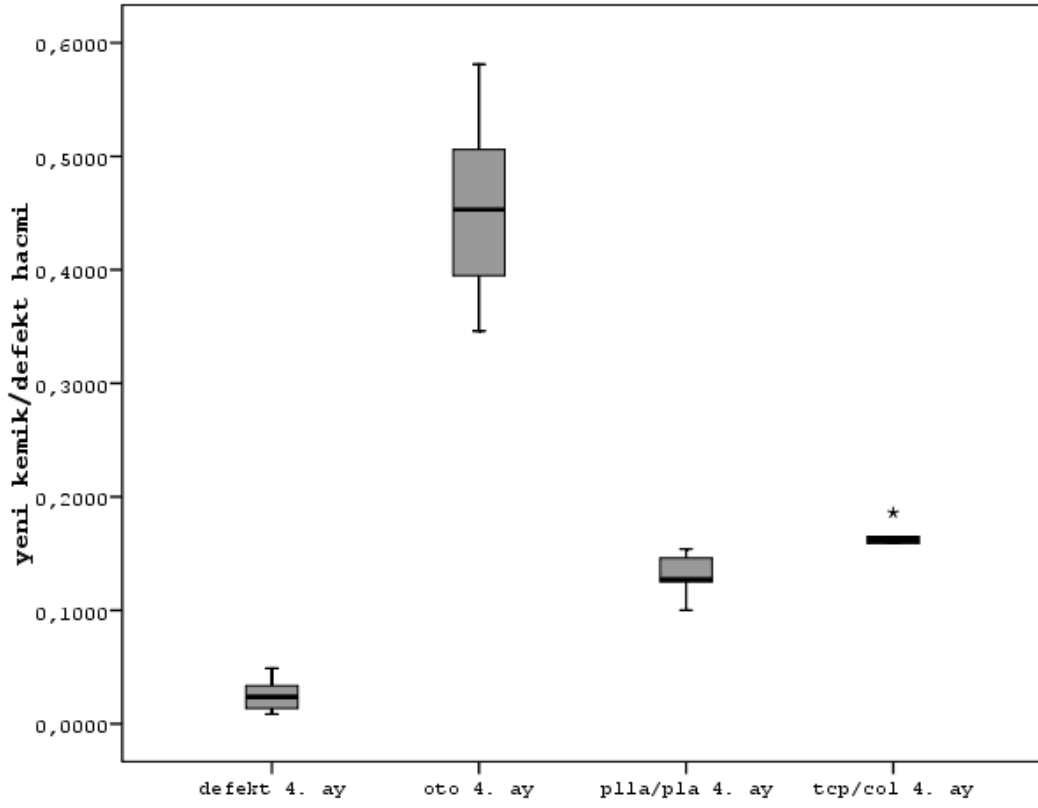
Şekil 4.3. B-TBC-kollojen grubunun 1. ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları



Şekil 4.4. Kaprolakton grubunun 1. ve 4. Aylarına ait tomografik radyografları

Tablo 4.1. 1.ay yeni oluşan kemik hacimlerinin defekt hacimlerine oranı

Sonuçlara bakıldığında 1. ay için en iyi kemikleşme oranlarının otogreft grubunda olduğunu görmekteyiz ve diğer 3 gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir. 1. ay için otogreft grubuna en yakın yeni kemikleşme **Kollajen/ β -TCP** grubunda görülmektedir, bu grupta yeni kemik oluşumu kontrol grubu olan defekt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak gözlemlenmiştir. 1. ay sonuçlarına göre **Kollajen/ β -TCP** grubundaki kemikleşme oranları diğer doku iskelesi grubu olan **Kaprolakton** grubuna göre artmış olarak gözükse de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Yine **Kaprolakton** grubunda yeni kemik oluşumu kontrol grubu olan defekt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2. 4.aydaki yeni oluşan kemik hacimlerinin defekt hacimlerine oranı

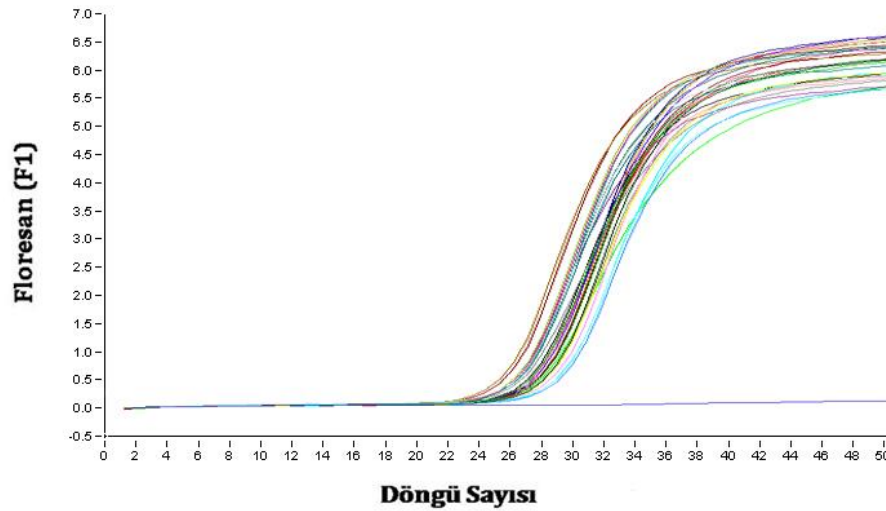
4. ay için en iyi kemikleşme oranlarının otogreft grubunda olduğunu görmekteyiz ve diğer 3 gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir. 4. ay için otogreft grubuna en yakın yeni kemikleşme **Kollajen/β-TCP** grubunda görülmektedir, bu grupta yeni kemik oluşumu kontrol grubu olan defekt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak gözlemlenmiştir. 4. ay sonuçlarına göre **Kollajen/β-TCP** grubundaki kemikleşme oranları diğer doku iskelesi grubu olan **Kaprolakton** grubuna göre artmış olarak gözükse de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Yine **Kaprolakton** grubunda yeni kemik oluşumu kontrol grubu olan defekt grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak hesaplanmıştır. Aylara göre karşılaştırıldığında bir tek **Otogreft** ve **Kollajen/β-TCP** gruplarında 4. ay yeni kemik oluşumu 1. aya göre artmış olarak hesaplandı ancak istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.

4.2. GEN İFADE DÜZEYİ ÇALIŞMALARI

4.2.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP ve OSX genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler cihazı kullanıldı. Rat'ın rekonstrüksiyon edilmiş bölge dokusundan elde edilen Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP, OSX ve bu genlerin ifadeleneşini normalize etmek için ACTB genlerine özgül primerler ve UPL LNA problrı kullanılarak çalışıldı.

Gen ifadeleneşinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan her bir genin ve referans gen ACTB'nın mRNA düzeyinde ifadeleneşini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrileri elde edilmiştir. Bu amplifikasyon eğrilerine örnek olarak Runx2 geninin mRNA düzeyinde ifadeleneşini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Runx2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri

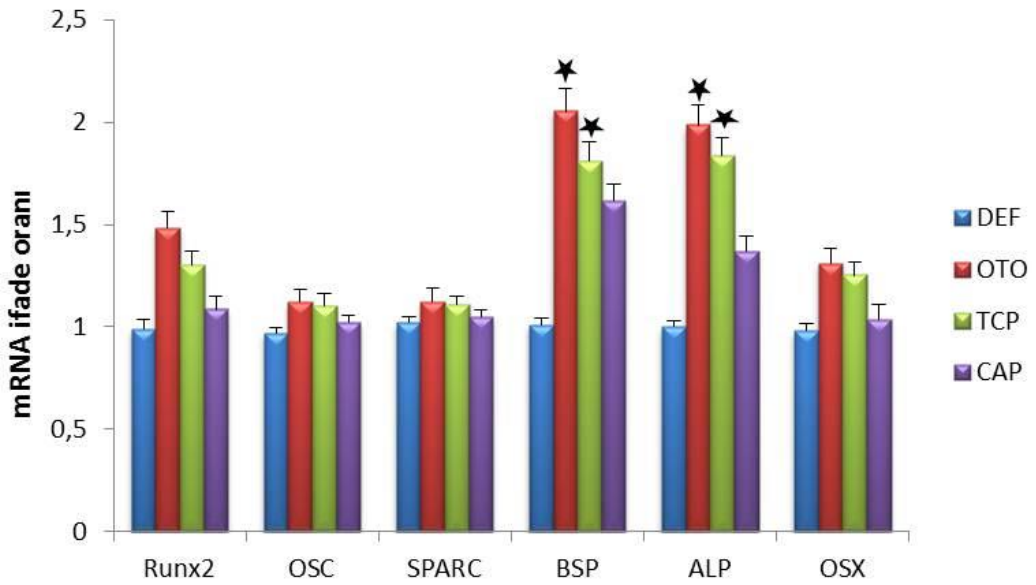
ACTB geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde, floresans sinyal ise dikey ekseninde yer almaktadır.

4.2.2. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

Real Time PCR tepkimesinde primerlerin ilgili ve kendilerine özgün gen dizilerine bağlanması, o genin ortamdaki derişimi ile doğru orantılıdır. Böylece belirli bir gene ait mRNA ortamda ne kadar fazla bulunursa eşleşmeyle doğru orantılı seyreden amplifikasyonlar ışmanın o kadar erken gerçekleşmesine neden olur. Göreceli gen ifade düzeylerinin karşılaştırmalı analizleri REST, 2009 programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplanmıştır. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir [94].

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

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresans sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔC_t değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, eşitlikte elde edilen R ise oranını göstermektedir [95].



Tablo 4.6. Her grup için cerrahi işlem bölgesinden alınan doku örneklerinin 7. gündeki Runx2, OSC, SPARC, BSP, ALP ve OSX genlerinin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik

Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$. (Burada DEF: Defekt (kontrol) grubunu, OTO: Ototogreft grubunu, TCP: Trikalsiyum fosfat grubunu ve CAP: Kaprolakton grubunu göstermektedir).

Kemik oluşumunun erken dönem belirteci olan Runx2 transkripsiyon faktörünün, 7. günde otogreft, Kollajen/ β -TCP ve Kaprolakton gruplarında defekt grubuna kıyasla sırasıyla arttığı / up regüle olduğu gözlenirse de, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Runx2'nin BSP ve ALP genlerini aktifleştirdiği bilinmektedir. Bu 2 genin 7. gündeki ifade düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmektedir. Bu bilgi doğrultusunda Runx2'nin BSP ve ALP gen regülasyonunu sağlayıp defekt grubuna göre arttığı bu artışın anlamlı düzeyde olmamasının, bu iki geni aktive etmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Daha geç dönemde ifade edilen genlerden biri ve kemiğe özgü bir gen olan OSC geninin mRNA ifadenme düzeylerinde otogreft, Kollajen/ β -TCP ve Kaprolakton gruplarında defekt grubuna kıyasla 7. gün incelemelerinde çok az da olsa bir artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak herhangi bir anlam gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Yine geç dönemde ifade edilen, geç dönem osteojenik farklılaşmanın bir belirteci ve kemiğin mineralizasyon evresine geçtiğini gösteren bir gen olan SPARC geninin mRNA ifadenme düzeylerinde otogreft, Kollajen/ β -TCP ve Kaprolakton gruplarında defekt grubuna kıyasla 7. gün incelemelerinde yine az da olsa bir artış gözlenirse de, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

BSP geninin 7. günde otogreft grubunda defekt grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlendi ($p < 0.05$). Kollajen/ β -TCP grubunda da BSP mRNA ifadenme düzeyinde anlamlı bir artış belirlenirken ($p < 0.05$), Kaprolakton grubunda BSP mRNA ifadenme düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi ($p > 0.05$). otogreft grubunun BSP mRNA ifadenme düzeyi diğer 2 gruba göre daha fazla iken, Kollajen/ β -TCP grubundaki ifadenmenin Kaprolakton grubundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

ALP mRNA ifadenme düzeyinin 7. gün incelemelerinde OTO ve Kollajen/ β -TCP gruplarında defekt grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0.05$). otogreft grubundaki bu artış, implante edilen otogreftin bünyesinde osteoblastları barındırdığı düşünülürse bu beklenen bir sonuçtur. Bunun yanısıra Kaprolakton grubunda ALP mRNA ifadenme düzeyinde de artış görülmesine rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Osteoblast farklılaşması, kemik oluşumu ve gelişiminde görevli bir diğer transkripsiyon faktörü olan OSX geninin mRNA ifadenme düzeyinin otogreft, Kollajen/ β -TCP ve Kaprolakton gruplarında defekt grubuna kıyasla arttığı gözlenmesine rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Grafik x). OSX transkripsiyon faktörünün kemik oluşumu ve gelişiminde geç dönem belirteci olduğu düşünülürse, OSX mRNA ifadenme düzeyinin 7. günde anlamlı düzeyde olmayan artışı beklenen bir sonuçtur. Ayrıca OSX transkripsiyon faktörünün, OSC ve SPARC gen ifadenmelerini aktifleştirdiği bilinmektedir. 7. günde OSC ve SPARC genlerindeki ifadenme düzeylerindeki anlamlı düzeyde olmayan artışları da bu bilgi doğrultusunda beklenen bir sonuçtur. OSX gen ifadenme düzeyindeki bu sonuç OSC ve SPARC genlerinin ifade düzeylerindeki artışla paralellik göstermektedir.

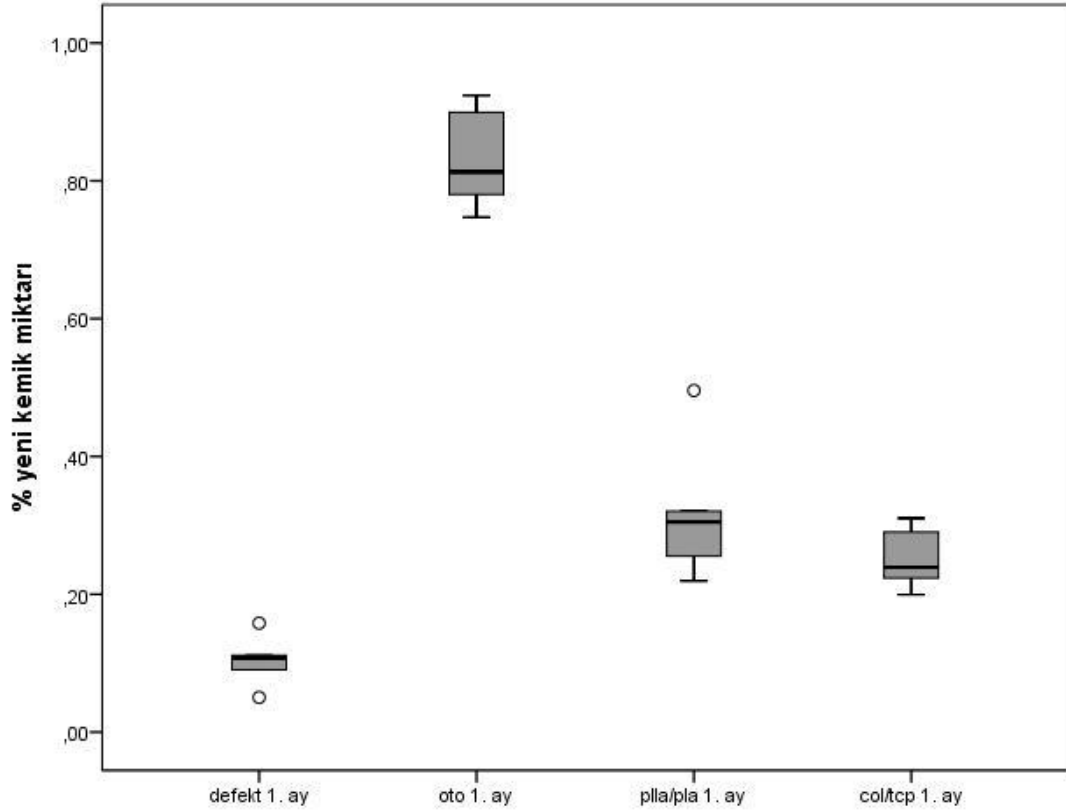
Elde edilen mRNA ifadenme düzeyi sonuçlarının yeni kemik oluşum süreciyle uyumlu olduğu gözlenmektedir. Erken dönem gen ifadenme düzeyi çalışmamızın sonuçları doğrultusunda, otogreft grubunda incelenen genler açısından iyi bir kemik hücre gelişimi ve matriks sentezi beklenmelidir. Bunun yanısıra Kollajen/ β -TCP grubunda kemik hücresi gelişimi ve matriks sentezi de altın standart olan otogreft grubu ile rekabet edebilecek sonuçlara sahip olduğu gözlenmiştir.

4.3. HİSTOLOJİK BULGULAR

Birinci ayda otogreft grubundaki yeni oluşan kemik miktarı tüm defekt alanı ile oranlandığında boş defekt grubu, Kollajen/ β -TCP grubu ve kaprolakton grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.004$, $p=0.002$). Birinci ayda defekt ile Kollajen/ β -TCP ve PLLA/PCL grupları karşılaştırıldığında doku iskelesi uygulanan her iki grupta yeni kemik miktarı anlamlı

olarak artmıştı (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.004$). Birinci ayda doku iskelesi uygulanan gruplara arasında anlamlı fark saptanmadı (tablo 4.7).

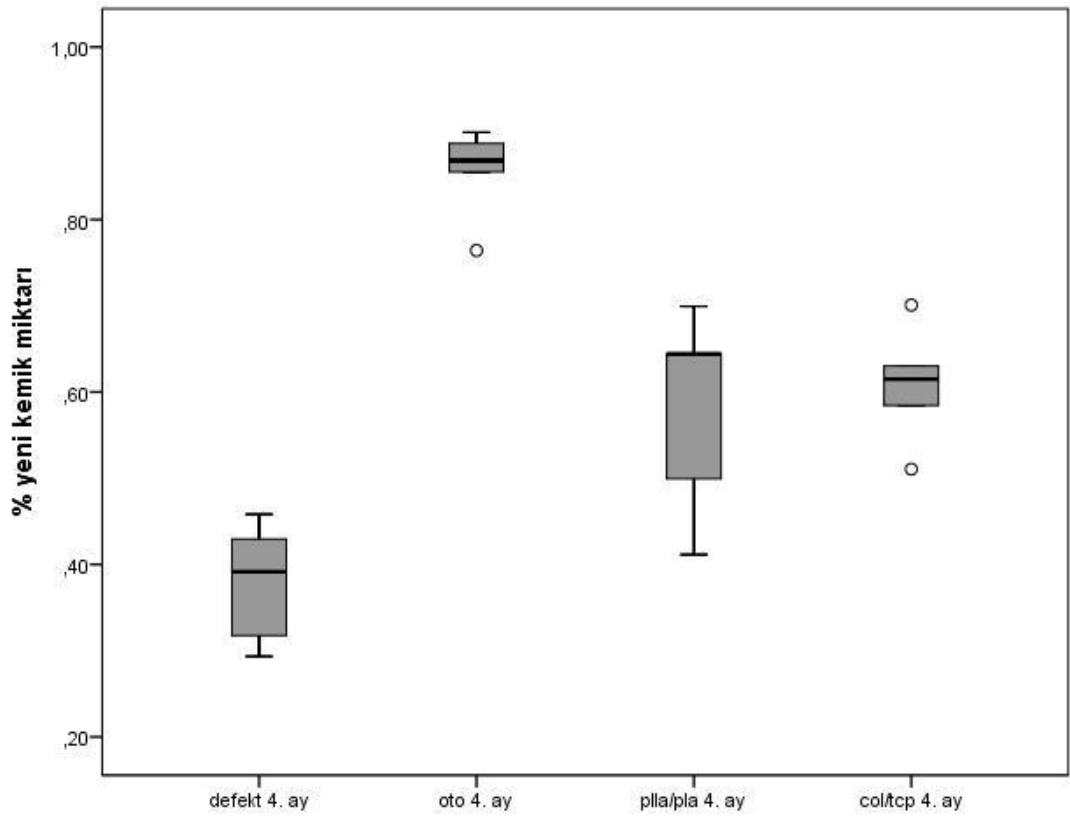
Tablo 4.3. Dokuların 1.ay histolojik verilerinin istatistiksel analizi



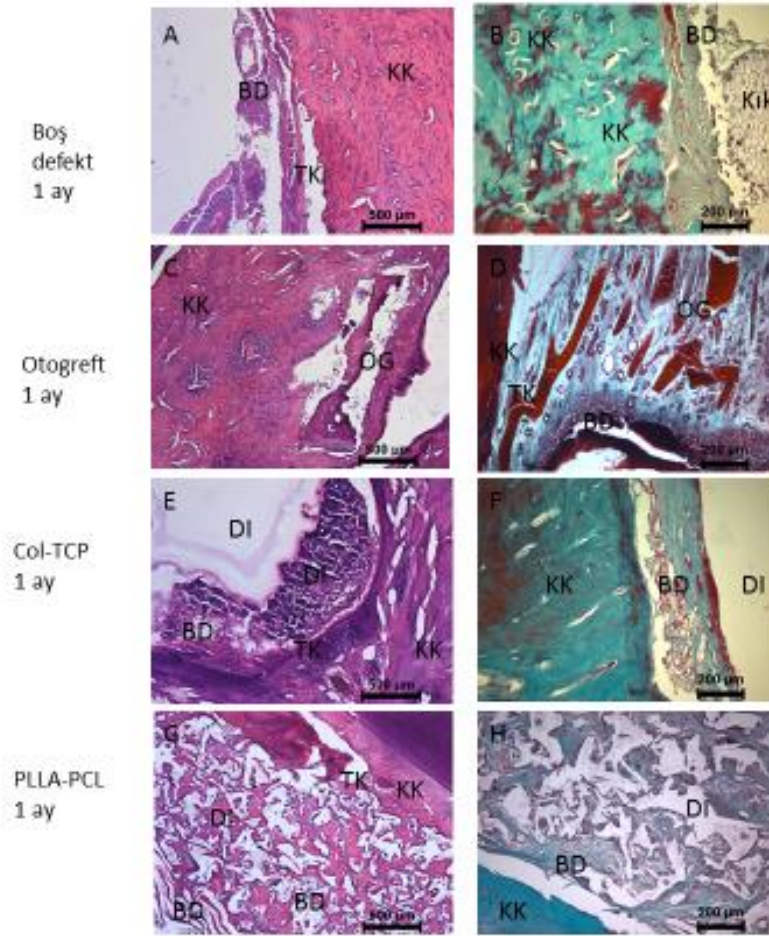
Dördüncü ayda otogreft uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı boş defekt, Kollajen/ β -TCP ile PLLA/PCA doku iskelelerinin uygulandığı gruba göre daha çoktu (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.004$, $p=0.004$). Boş defekt grubu ile Kollajen/ β -TCP grubu karşılaştırıldığında Kollajen/ β -TCP uygulanan grupta yeni kemik miktarı anlamlı olarak artmıştı ($p=0.004$). Bu dönemde boş defekt grubu ile PLLA/PCL grubu arasında yeni kemik miktarı açısından anlamlı fark saptanmadı. Dördüncü ayda Kollajen/ β -TCP uygulanan grupla PCL/PLLA uygulanan gruba göre kemik

oluşum miktarı olarak artış gözüksede istatiksiksel olarak anlamlı saptanmadı. (tablo 4.8.)

Tablo 4.4. Dokuların 4.ay histolojik verilerinin istatistiksel analizi

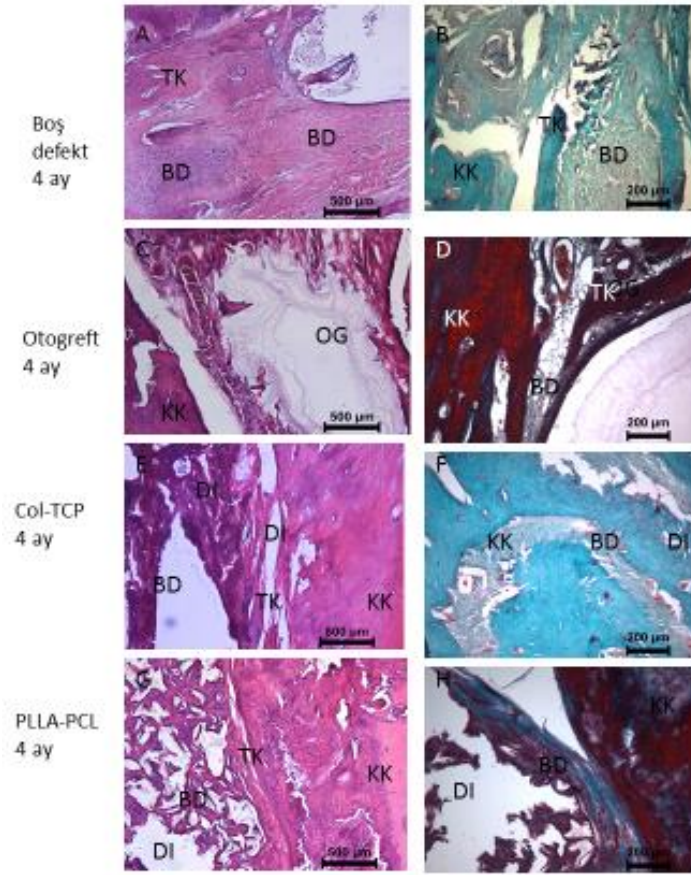


Birinci aydan dördüncü aylar karşılaştırıldığında sadece otogreft grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Her iki doku iskelesinde zamanla kemik miktarlarda artış gözüksede istatiksiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 5.1. 1. ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları

Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 4 aylık alveolar defekt alanına ait tümü 200“lük büyütmede elde edilmiş mikrograflardır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, DI: Doku iskelesi, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom



Şekil 5.2. 4.ay gruplarının yeni kemik oluşumunun dokuda histolojik boyama bulguları

Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 4 aylık alveolar defekt alanına ait tümü 200^lük büyütmede elde edilmiş mikrograflardır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, DI: Doku iskelesi, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom

Kollajen/ β -TCP uygulanan grupta, biyomalzemeye hafif ila orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri gözlemlendi. Nekroz ve ciddi yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmamıştır. Histolojik takip sırasında kısmen eriyen doku iskeleleri çevresinde tıkHz bağ dokusu ve komşuluğunda yeni kemik spiküllerinin oluşumu izlendi. Otogreft, doku iskeleleri uygulanan gruplarda defekti dolduran bağ dokusu damardan daha zengin ve oluşan yeni kemik trabekülleri diğer gruplara göre daha büyüktü (Şekil 5.1 ve 5.2). Kollajen/ β -TCP uygulanan grupta degrade olan polimer adacıklarının arasında düzenli bağ dokusu kompartmanlarının geliştiği dikkati çekti. Ancak gruplardaki denek sayılarının kısıtlılığı nedeniyle gruplar arasında her zaman anlamlı farklılık izlenmedi

5. TARTIŞMA

Plastik cerrahide damak dudak yarıklarının onarımında karşılaşılan en büyük problemlerden biri alveoler kemik defektlerinin rekonstrüksiyonudur. Plastik cerrahi rutin uygulamalarında bu tedavi seçeneklerinin maliyeti, uzun yatış süreleri, donör ve alıcı saha morbiditesi gibi sorunları mevcuttur [96].

Alveoler yarık tedavisinde kullanılabilecek seçeneklerin başında kuşkusuz kemik otogreftleri gelmektedir. Ancak otogreftinin belirli kısıtlamaları vardır, donör alanda ağrı, deformite gelişimi, komşu anatomik yapılara zarar verilebilecek olması, ameliyat süresinin uzun olması, skar gelişimi, maliyeti, uzun yatış süreleri, kemik greftinin kaybı bu risklerin başında gelmektedir [97].

Bu gibi kısıtlamalar ve istenen kemik grefti kaynağının sınırlı olması nedeniyle doku mühendisliği teknikleri ile geliştirilen kemik grefti alternatiflerinin üretilmesi fikri heyecan yaratmıştır. Farklı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve etkinliğinin artırılması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Doku mühendisliğinin plastik cerrahide ki klinik uygulamalarından biri 2009 yılında Behnia ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dudak damak yarığında sekonder gelişen alveolar yarığın tedavisinde 2 olguda mezenkimal kök hücre yüklenmiş demineralize kemik matriksi kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [98]. Van Hout ve ark. 2011 yılında yayınladıkları çalışma ile BMP katkılı doku iskelesinin alveoler yarık tedavisinde kemik greftinin yerini alabileceklerini göstermişlerdir [99].

2008 yılında Phuong D.Nguyen ve ark. ilk defa rat modelinde alveoler yarık modeli geliştirdiler. Bu çalışmada rat için kritik-boyuttaki alveoler kemik defektinin boyutları 7x4x3 mm olarak belirlenmiştir [100]. Yine aynı ekip tarafından rhBMP-2 yüklü doku iskelesi ile alveoler yarık onarımı çalışılmıştır [101]. Ancak bu çalışmanın grupları arasında doku iskelesi ile karşılaştırmada altın standart olarak kabul edilen ve halen klinik uygulamada rutin olarak kullanılmakta olan otogreft grubu oluşturulmamıştır. Dolayısı ile doku iskelelerinin kullanıldığı deney grupları sonuçlarının otogreft sonuçları ile karşılaştırılması mümkün olamamaktadır.

Bu tez çalışmasında, daha önceki deney modelleri ve çalışmalar dikkate alınmış, osteokondüktif özellikleri artırılarak daha geliştirilmiş yeni bir doku iskelesi olan Kollajen/ β -TCP, tercih edilmiş ve altın standart tedavi yöntemi olan otogreft ile karşılaştırılmıştır.

Kollajen/ β -TCP doku iskelesi, yapısındaki trikalsiyum fosfat ile osteokondüksiyon özelliğinin, kollojen eklenerek de osteoindüktif özelliğinin artırılması amaçlanmıştır. Bu iki kavramın bir arada bulunması ideal bir kemik doku iskelesinde istenen özelliklerdir. Bu doku iskelesinin üretim tekniği ve özellikleri Hacettepe üniversitesi Kimya ve Biyomühendislik bölümü Araştırma laboratuvarlarında tanımlanmış ve tamamlanmış olup aynı merkezde üretilmiştir.

Kontrol grubunun(kritik boyutlu kemik defekti grubu) histolojik ve mikrotomografi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde defektin kendiliğinden kapanmamış olması oluşturulan deney modelinin uygun olduğunu göstermektedir.

Otogreft grubunda ise hem histolojik hem radyolojik analizlerde en iyi kemikleşmenin olduğu görülmüştür.İlerleyen süreçte otogreftte istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber greft rezorpsiyonu gözlenmiştir. Bu gözlem klinikte kullanılan kemik otogreft uygulamalarındaki sonuçlarla uyumludur.

Kollajen/ β -TCP kullanıldığı deney grubunun sonuçları incelendiğinde kontrol(defekt) grubunun sonuçlarına göre istatistiksel olarak ta anlamlı olan yeni kemik oluştuğu saptanmıştır, ayrıca altın standart tedavi yöntemi olan otogreft grubuna en yakın sonuçlar bu grupta gözlenmiştir.

Mineralize yeni kemik oluşum sürecinde rol oynayan moleküler düzenleyicilerin etkileri göz önüne alındığında kullanılan doku iskelesinin pre osteoblast-osteoblast dönüşümünde etkili olması öngörülmüştür..Beklendiği üzere bu basamakta etkili olan moleküler belirteçlerden runx2 ve osx'ın ifade düzeylerinin artmış olduğu görüldü. Preosteoblast öncesi basamak ve osteoblast oluşum sonrası basamaklara ait moleküler belirteçlerde artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Histolojik verilere göre incelenen tüm zaman dilimlerinde otogreft uygulanan gruplarda kemik yapımı hızlanmıştır. Çünkü greft içinde canlı preosteoblast ve osteoblastlara ilave olarak kemik ekstraselüler matriksi ve mineralize kemik iskelesi mevcuttur, bu unsurlar hazır olarak verildiğinden en iyi sonuçların görülmesinde temel nedendir. Birinci ayda her iki doku iskelesi türünün sonuçları defekt grubununkine göre yeni kemik oluşumunun daha fazla olduğu görülmüştür. Dördüncü aydaki yeni kemik yapımına bakıldığında, Kollajen/ β -TCP uygulanan grupta, otogreft grubuna en yakın düzeyde olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen grupların hiçbirisinde kritik boyuttaki alveoler kemik defekti tam olarak kapanmamış ve kemikleşmemiştir. Bu durum literatür ile uyumludur.

Kemik doku rekonstrüksiyonu çalışmalarında otogreftin kullanılmadığı durumlarda osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerin birarada olduğu doku iskelesi henüz tanımlanmamış olmasından, bir grup araştırmacı bu iskeleleri hücreli(kök hücre, osteoblast, preosteoblast) olarak tasarlamakta ve böyle ideal olabileceğini iddia etmektedirler. Ancak böyle bir iskelenin hazırlanmasının teknik zorluğu, ön hazırlık gerektirmesi, maliyetinin fazla olması, raf ömrünün olması nedeniyle klinikte uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır. Bu öngörüden dolayı hücresiz doku iskelelerinin geliştirilmesinin daha doğru olacağı ve klinik sorunların çözümünde daha rasyonel cerrahi çözümlerin gelişimine öncülük edeceğine inanmaktayız.

6. SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında alveoler bölge defektlerinde altın standart tedavi yöntemi otojen kemik grefti olmasına karşın, doku mühendisliği ve yöntemleri ile geliştirilen doku iskeleleride maliyet, donör saha morbiditeleri, hastanede yatış süreleri düşünüldüğünde alternatif bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında da değinildiği üzere henüz tüm

ihtiyaçları karşılayan ideal bir doku iskelesi bulunmamaktadır.Doku iskelesi olarak geliştirilen ve kullanılan Kollajen/ β -TCP kombinasyonunun alveoler kemik defekti onarımlarında alternatif ürün/alloplastik materyal olarak kullanılabilceği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242** (4885): p. 1528-34.
2. Cohen, M.M., Jr. and A. Bankier, *Syndrome delineation involving orofacial clefting*. Cleft Palate Craniofac J, 1991. **28** (1): p. 119-20.
3. Wyszynski, D.F., T.H. Beaty, and N.E. Maestri, *Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited*. Cleft Palate Craniofac J, 1996. **33** (5): p. 406-17.
4. Tunçbilek G, Özgür F, Balcı S. 1229 yarık dudak ve damak hastasında görülen ek malformasyon ve sendromlar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2004;47:172-6
5. Tunçbilek E, ed. *Türkiye’de konjenital malformasyon sıklığı, dağılımı, risk faktörleri ve yenidoğanların antropometrik değerlendirilmesi*. Ankara: Tubitak Matbaası; 1996.
6. Sato, Y., et al., *Success rate of gingivoperiosteoplasty with and without secondary bone grafts compared with secondary alveolar bone grafts alone*. Plast Reconstr Surg, 2008. **121** (4): p. 1356-67; discussion 1368-9.
7. Rawashdeh, M.A., *Morbidity of iliac crest donor site following open bone harvesting in cleft lip and palate patients*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008. **37** (3): p. 223-7.
8. Calvert, J.W., et al., *Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces*. J Biomed Mater Res, 2000. **52** (2): p. 279-84.
9. Schnell, E., et al., *Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend*. Biomaterials, 2007. **28** (19): p. 3012-25.
10. Klaskova, O., [*Incidence of cleft lip and palate in Bohemia*]. Rozhl Chir, 1974. **53** (3): p. 147-50.

11. Rollnick BR, Pruzansky S. *Genetic services at a center for craniofacial anomalies.* *Cleft Palate J.* 1981;18:304-13.
12. Callas, G. and B.E. Walker, *Palate morphogenesis in mouse embryos after x-irradiation.* *Anat Rec*, 1963. **145**: p. 61-71.
13. Ferm, V.H. and L. Kilham, *Congenital Anomalies Induced in Hamster Embryos with H-1 Virus.* *Science*, 1964. **145** (3631): p. 510-1.
14. Tocci, P.M. and B. Beber, *Abnormal phenylalanine loading tests in mothers of children with cleft defects.* *Cleft Palate J*, 1970. **7**: p. 663-8.
15. Davis JS, Ritchie HP. *Classification of congenital clefts of the lip and palate.* *Jama* 1922;79:1323.
16. Veau V, Borel S. *Division palatine.* Paris,; Masson et cie; 1931.
17. Pruzansky S. *Description, classification, and analysis of unoperated clefts of lip and palate.* *Am J Orthod* 1953;39:590.
18. Kernahan, D.A. and R.B. Stark, *A new classification for cleft lip and cleft palate.* *Plast Reconstr Surg Transplant Bull*, 1958. **22** (5): p. 435-41.
19. Kriens O. *Documentation of cleft lip, alveolus and palate.* In: Bardach J, Morris HL, eds *Philadelphia: WB Saunders; 1990; 127.*
20. Eiselberg FV. *Zur technik der uranoplastik.* *Arch clin chir* 1901;64:509.
21. Lexer E. *Vervendung der freinen knochenplastik nebst versucher uber gelenkversteifung und gelenktransplantation.* *Arch clin chir* 1908;86:939.
22. Drachter R. *Die gaumenspalte und deren operative behandlug* *Dtsch Zschr chir* 1914;131:1.
23. Veau V, Borel S. *Division palatine.* Paris,; Masson et cie; 1931.
24. Schuchardt, K. and G. Pfeifer, [*Experiences with primary bone transplantations in harelip and cleft palate*]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir*, 1960. **295**: p. 881-4.
25. Boyne, P.J. and N.R. Sands, *Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts.* *J Oral Surg*, 1972. **30** (2): p. 87-92.

26. Cohen, M., J.W. Polley, and A.A. Figueroa, *Secondary (intermediate) alveolar bone grafting*. Clin Plast Surg, 1993. **20** (4): p. 691-705.
27. Jensen, J., S. Sindet-Pedersen, and H. Enemark, *Reconstruction of residual alveolar cleft defects with one-stage mandibular bone grafts and osseointegrated implants*. J Oral Maxillofac Surg, 1998. **56** (4): p. 460-6; discussion 467.
28. Kalaaji A, Lilja J, Friede H. *Bone grafting at the stage of mixed and permanent dentition in patients with cleft of the lip and primary palate*. Plast Reconstr Surg 1994;93:690-6.
29. Bureau, S., M. Penko, and L. McFadden, *Speech outcome after closure of oronasal fistulas with bone grafts*. J Oral Maxillofac Surg, 2001. **59** (12): p. 1408-13; discussion 1413-4.
30. Tachimura, T., et al., *Effect of temporary closure of oronasal fistulae on levator veli palatini muscle activity*. Cleft Palate Craniofac J, 1997. **34** (6): p. 505-11.
31. Helms, J.A., T.M. Speidel, and K.L. Denis, *Effect of timing on long-term clinical success of alveolar cleft bone grafts*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1987. **92** (3): p. 232-40.
32. Canady, J.W., et al., *Suitability of the iliac crest as a site for harvest of autogenous bone grafts*. Cleft Palate Craniofac J, 1993. **30** (6): p. 579-81.
33. Troxell, J.B., R.J. Fonseca, and D.B. Osbon, *A retrospective study of alveolar cleft grafting*. J Oral Maxillofac Surg, 1982. **40** (11): p. 721-5.
34. Taner D. *Fonksiyonel anatomi: Extremiteler ve sırt bölgesi 1996, Ankara: Hekimler yayın birliği.*
35. Moore, K.L., *Overview anatomy, in clinically oriented anatomy, M.K.L., Editor 1992 Williams & Wilkins: Baltimore. p. 11-16.*
36. Mersher A.L., *Jungueira's Basic Histology. 12 ED 2009, USA: McGraw-Hill Medical. 141-160.*
37. Rosenberg, A., *Bones, Joints and Soft Tissue Tumors, in Robbins Pathologic Basis of Disease, K.V. Cotran R., Collins T., Editor 1999.*

38. *Jungueira L.C., Kelly R.O., Basic Histology. 7 ed 1992, Lebanon: Appleton&Lange.*
39. *Shui, C., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L. and Khosla, S.J Bone Miner Res 2003; 18:213-21.*
40. *Qi, H., Aguiar, D. J., Williams, S. M., La Pean, A., Pan, W. and Verfaillie, C. M. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:3305-10*
41. *Roelofsen, J., Klein-Nulend, J. and Burger, E. H.J Biomech 1995; 28:1493-503.*
42. *D'Addario, M., Arora, P. D., Ellen, R. P. and McCulloch, C. A.J Biol Chem 2003;.*
43. *G. R. Kirkham and S. H. Cartmell, Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis, Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini, 2007..*
44. *Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. Cell 1997; 89:747-54.*
45. *Selvamurugan, N., Chou, W. Y., Pearman, A. T., Pulumati, M. R. and Partridge, N.C.J Biol Chem 1998; 273:10647-57*
46. *Kern, B., Shen, J., Starbuck, M. and Karsenty, G.J Biol Chem 2001; 276:7101-7*
47. *Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T. and Nakatsuka, M.J Biol Chem 1999; 274:6972- 8.*
48. *Jagodzinski, M., Drescher, M., Zeichen, J., Hankemeier, S., Krettek, C., Bosch, U. And van Griensven, M. Eur Cell Mater 2004; 7:35-41; discussion 41*
49. *Klein-Nulend, J., Roelofsen, J., Semeins, C. M., Bronckers, A. L. and Burger, E. H.J Cell Physiol 1997; 170:174-81*
50. *Melkko J, Niemi S, Risteli L, Risteli J. Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. Clinical Chemistry 1990; 36: 1328-1332..*

51. Melkko J, Kauppila S, Niemi S ve ark. Immunassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clinical Chemistry* 1996; 42: 947-954..
52. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM, Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone, 1989 Jul;69 (3):990-1047..
53. Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *New Eng J Med.* 1980;302:1460-6
54. Gundberg CM, Nishimoto SK. Vitamin K dependent proteins of bone and cartilage. In: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP eds. Academic Press, San Diego;1999, 43-58
55. Terpos E, Politou M, Rahemtulla A, The role of markers of bone remodeling in multiple myeloma, 2005 May;19 (3):125-42.
56. G. R. Kirkham and S. H. Cartmell, *Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis*, Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini, 2007..
57. Terpos E, Politou M, Rahemtulla A, The role of markers of bone remodeling in multiple myeloma, 2005 May;19 (3):125-42..
58. Rotllant J, Liu D, Yan YL, Postlethwait JH, Westerfield M, Du SJ, Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear, 2008 Jul;27 (6):561-72.
59. Brekken, R.A., Sage, E.H., 2001. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix communication. *Matrix Biol*
60. Castillo and Charles H. Turner, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006. 8:455–98
61. Bach, F.H., 1998, *Xenotransplantation: problems and prospects*, *Annu. Rev. Med.*, 49: 301–10
62. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3:282–86
63. Skalak R., Fox, C.F., 1991, *Tissue Engineering*, *Ann. Biomed. Eng.*, 19:529–33..

64. Hong-DeWu M, Kouchi Y, Onuki Y, et al. 1995. *Effects of differential shear stress on platelet aggregation, surface thrombosis, and endothelialization of bilateral carotid-femoral grafts in the dog.* *J. Vasc. Surg.* 22:382–92.
65. Huynh T, Abraham G, Murray J, et al. 1999. *Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel.* *Nat. Biotech.* 17 (11):1083–86
66. Bisceglie V. 1933. *Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-Embryonen.* *Ztschr. Krebsforsch.* 40:122–40
67. Langer R. ve J.P.Vacanti *Tissue engineering.* *Science*,1993. 260 (5110):p.920-6.
68. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering.* *J Cell Mol Med*, 2006. **10** (3): p. 569-76.
69. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction.* 1965. *Clin Orthop Relat Res*, 2002 (395): p. 4-10.
70. Zambonin, G., et al., *Hydroxyapatite coated with insulin-like growth factor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity in vitro.* *Acta Orthop Scand*, 1999. **70** (2): p. 217-20.
71. Santos T.C., ve ark., *VEGF and FGF-2 incorporation in starch-based bone tissue engineering constructs promote the in vivo expression of neovascularisation mediators.**Tissue Eng Part A*,2012.
72. Bai, Y., et al., *BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* *Biotechnol Lett*, 2013. **35** (3): p. 301-8.
73. Macchiarini, P., et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway.* *Lancet*, 2008. **372** (9655): p. 2023-30.
74. Calvert, J.W., L.E. Weiss, and M.J. Sundine, *New frontiers in bone tissue engineering.* *Clin Plast Surg*, 2003. **30** (4): p. 641-8, x.

75. Perry, C.R., *Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes*. Clin Orthop Relat Res, 1999 (360): p. 71-86.
76. Bitar, K.N. and E. Zakhem, *Tissue engineering and regenerative medicine as applied to the gastrointestinal tract*. Curr Opin Biotechnol, 2013. **24** (5): p. 909-15.
77. Panetta, N.J., D.M. Gupta, and M.T. Longaker, *Bone tissue engineering scaffolds of today and tomorrow*. J Craniofac Surg, 2009. **20** (5): p. 1531-2.
78. Giordano, R.A., et al., *Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing*. J Biomater Sci Polym Ed, 1996. **8** (1): p. 63-75.
79. Qi, X., J. Ye, and Y. Wang, *Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2009. **89** (4): p. 980-7.
80. Boccaccini, A.R. and J.J. Blaker, *Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds*. Expert Rev Med Devices, 2005. **2** (3): p. 303-17.
81. *Hutmacher, D.W., 2001, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 12 (1):107-24. .*
82. *Nishimura, I., Garrel, R.L., Hedrick, M., Iida, K., Osher, S, Wu, B., 2003, Precursor tissue analogs as a tissue-engineering strategy, Tissue Eng., 9 (sup. 1): 77-89.*
83. *Liu, X. and Ma, P.X., 2004, Polymeric scaffolds for bone tissues engineering, Ann. Biomed. Eng., 32 (3):477-86.*
84. *Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Yamaguchi, A., Toyama, Y., Hata, J., Umezawa, A., 2003, Use of isolated mature osteoblast in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge, J. Cell. Physiol., 194 (1):45-53.*

85. Agrawal, C.M., Mckinney, J.S., Huang, D., and Athanasiou, K.A., 2000, *Synthetic biosorbable polymers for implants, 1st ed.*, ASTM, Philadelphia. .
86. Murphy, W.L., Dennis, R.G., Kileny, J.L., and Mooney, D.J., 2002, *Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds*, *Tissue Eng.*, 8 (1):43-52..
87. Gomes, M.E., Godinho, J.S., Tchalamov, D., Cunha, A.M., and Reis, R.L., 2002, *Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing 128 methodologies, morphology, degradation and mechanical properties*, *Mater. Sci. Eng., C 20 (1-2)*:19-26..
88. Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., and Chua, C.K., 2001, *The design of scaffolds for use in tissue engineering, Part I, Traditional factors*, *Tissue Eng.*, 7 (6):679-89..
89. Mooney, D.J., Baldwin, D.F., Suh, N.P., Vacanti, J.P., and Langer, R., 1996, *Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents*, *Biomaterials*, 17 (14):1417-22..
90. Aydin H.M., *Biyobozunur Polimerik Materyaller ve/veya Bunların Kalsiyum Fosfat Kompozitlerinin Üretimi ve Sert Doku Onarımında Kullanımı, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 58s*
91. Lu M., Rabie A.B.M.: *Quantitative assessment of early healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts using micro-computed tomography and Qwin image analyzer. Int J Oral Maxillofac. Surg.*, 2004; 33: 369-376
92. Aronin CEP, Sadik KW, Lay LA, Rion DB, Tholpady SS, Ogle RC, BotchweyEA. *Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds*, *J Biomed Mater Res* 89A: 632–641, 2009
93. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res* 2002; 30 (9): e36.

94. Pfaffl MW. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*, *Nucleic Acids Res* 2001; 29; 2002-2007.
95. Walker NJ. *A technique whose time has come*. *Science* 2002; 296; 557-559.
96. Millard D.R, Jr: *Embryological Theories, Chapter 1, Volume1, in Cleft Craft: The Evolution of its Surgery, Little, Brown and Company, Boston, 1976*
97. Millard D.R, Jr: *The Bilateral Deformity, Volume 2, in Cleft Craft: The Evolution of its Surgery, Little, Brown and Company, Boston, 1976*
98. Behnia, H., et al., *Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009. **108** (2): p. e1-6.
99. van Hout, W.M., et al., *Reconstruction of the alveolar cleft: can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? A literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2*. *Clin Oral Investig*, 2011. **15** (3): p. 297-303.
100. Nguyen, P.D., et al., *Establishment of a critical-sized alveolar defect in the rat: a model for human gingivoperiosteoplasty*. *Plast Reconstr Surg*, 2009. **123** (3): p. 817-25.
101. Nguyen, P.D., et al., *Scaffold-based rhBMP-2 therapy in a rat alveolar defect model: implications for human gingivoperiosteoplasty*. *Plast Reconstr Surg*, 2009. **124** (6): p. 1829-39.