



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA HIZLI ÜST ÇENE GENİŞLETMESİ SONRASI
VASKÜLER EPİTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN NANO
TAŞIYICILARLA UYGULANMASI İLE ÜST ÇENE
SUTURAL BÖLGESİNDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ

Dt. İBRAHİM BURAK AYDIN
DOKTORA TEZİ

ORTODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fulya ÖZDEMİR

İSTANBUL - 2013

TEŞEKKÜR

Ortodonti eğitimim boyunca bana sağladığı imkanlar için Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Türker Sandallı'ya,

Ortodonti eğitimim boyunca bana büyük emeği geçen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Tülin Arun'a,

Tezimin hazırlanmasında, başından sonuna kadar içten yardımları ve ortodonti eğitimime olan katkısı sebebi ile tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fulya Işık Özdemir'e,

Tezimin hazırlanmasında desteğini her zaman hissettiren Sayın Doç. Dr. Didem Nalbantgil'e,

Tez çalışmamdaki koşulsuz desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Mustafa Çulha'ya, Yrd. Doç. Dr. Ünal Uslu'ya ve Yrd. Doç. Dr. Alev Cumbul'a,

Eğitimime katkılarından dolayı tüm Ortodonti Anabilim Dalı öğretim üyelerine, görevlilerine, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve Anabilim Dalı çalışanlarıma,

Tezimin istatistiksel analizinde yardımlarını esirgemeyen İstatistik Uzmanı Sayın Selin Alıcı'ya,

Eğitimimin başından bugünlere kadar her aşamasında yanımda olup bana destek veren, her konuda varlıklarını yanımda hissettiren sevgili babam, annem ve ağabeyime,

Hayatımın en kıymetli ve zor dönemlerini beraber paylaştığım eşim Dr. Senem Başbuğ Aydın'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

SIÇANLARDA HIZLI ÜST ÇENE GENİŞLETMESİ SONRASI VASKÜLER EPİTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN NANO TAŞIYICILARLA UYGULANMASI İLE ÜST ÇENE SUTURAL BÖLGESİNDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Çalışmanın amacı, deneysel üst çene genişletmesi sonrasında altın nano taşıyıcılar ile uygulanan vasküler epitelyal büyüme faktörünün sıçanların üst çene sutural bölgesinde kemik remodelingine etkisinin histomorfometrik olarak incelenmesidir.

Çalışmada, 14 haftalık, 250g ağırlığında 5 grup, toplam 30 adet Wistar cinsi sıçanın üst çeneleri, 0,014 inç çapında paslanmaz çelik telden hazırlanmış heliksli genişletme aygıtı kullanılarak transversal olarak genişletilmiştir. Genişletme işleminin 5. gününde laboratuvar şartlarında hazırlanmış altın nano-parçacıklar (AuNP) ve vasküler epitelyal büyüme faktöründen (VEGF) oluşan kimyasal yapıdaki solüsyon sıçanların üst keser dişleri arasından başlayarak palatinal sub-mukozal alana enjekte edilmiştir. Çalışmada 5 grup vardır ve bu grupların hepsinde üst çene genişletmesi yapılmıştır. Bu 5 grupta, enjeksiyonu yapılan kimyasallar farklıdır, bu kimyasallar; serum fizyolojik, AuNP, VEGF, AuNP ile VEGF'nin karışımı ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF'dir. Enjeksiyonu takip eden 10. günde sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir. Deneyin sonunda, sıçanların üst çeneleri diseke edilmiş ve histomorfometrik inceleme için histolojik kesitler hazırlanmıştır. Boyanan kesitler, Stereoinvestigator 7.0.5 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hacim ölçümleri için Leica C Plan X10 objektif (NA = 0,22) kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada, izotonik serum fizyolojik enjekte edilmiş kontrol grubu ile AuNP, VEGF, AuNP+VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF enjekte edilmiş deney grupları yumuşak doku, kemik dokusu ve total kemik hacmi açısından karşılaştırılmıştır. Grupların homojenitesini değerlendirmek için Levene testi yapılmıştır ($p=0,216$, $p<0,05$). Homojen dağılım gösteren grupların karşılaştırılmasında ANOVA testi ve gruplar arası ikili karşılaştırmalar için de Tukey testi kullanılmıştır.

Çalışmanın histolojik değerlendirmesinde VEGF ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen yumuşak dokuları ve kemik dokusunu içeren total hacim incelendiğinde, VEGF grubunda ölçülen total hacim miktarı AuNP+VEGF grubunda gözlenen total hacimden istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0,05$, $p=0,028$). AuNP ve VEGF grupları arasında, yumuşak dokuları ve kemik dokusunu içeren total hacim ve tek başına yumuşak doku hacmi karşılaştırmasında, VEGF grubunda ölçülen total hacim ve yumuşak doku hacmi, AuNP grubunda gözlenen total hacim ve yumuşak doku hacmi miktarından istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ($p<0,05$, $p=0,046$), ($p<0,05$, $p=0,046$). VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında, ölçülen yumuşak doku hacimleri açısından karşılaştırma yapıldığında VEGF grubunda, AuNP+Oligonükleotid+VEGF grubuna göre yumuşak doku hacminin istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu görülmektedir ($p<0,05$, $p=0,046$).

Çalışmada elde edilen sonuçlar, VEGF'nin kemik gelişimini arttırdığını; ancak bu tezde anlatılan yöntem ile AuNP'lerin VEGF'in hücre içine taşınmasında kullanılmasının kemik gelişimini arttırmadığını ve VEGF'in yumuşak doku gelişiminde önemli role sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Altın nano parçacık, vasküler epitelyal büyüme faktörü, histomorfometri, sıçan, üst çene genişletmesi, kemik remodelingi

SUMMARY

EVALUATION OF CHANGES AT MAXILLARY SUTURAL REGION IN RATS CAUSED BY VEGF APPLIED WITH NANO PARTICLE CARRIERS FOLLOWING RAPID MAXILLARY EXPANSION

The aim of the study was to evaluate the bone remodelling effects of vascular epithelial growth factor (VEGF) applied through gold nano-particle (AuNP) carriers at the maxillary sutural region of rats after experimental maxillary expansion by histomorphometric analysis.

In this study, a total of 30 Wistar rats that were 14 week old, 250 g weight were divided in 5 groups. Their maxillas were expanded transversally by expansion appliance with helixes that were bended from 0.014 inch diameter stainless steel arch wire. Chemical solution with gold nano particles and vascular endothelial growth factor was prepared in laboratory conditions and at the 5th day of expansion they were injected between central teeth to the palatal submucosal region of rats. In the experiment there are 5 groups to which palatal expansion done. In this 5 groups, different chemical solutions as isotonic saline, AuNP, VEGF, AuNP-VEGF mixture and AuNP+Oligonucleotide+VEGF were injected. 10 days after injection rats were sacrificed. At the end of the experiment, maxillas of rats were dissected and histological sections were prepared for histomorphometric evaluation. Stained sections were analysed using Sterioinvestigator 7.0.5 program. For volumetric measurements Leica C Plan X10 objektive (NA = 0.22) was used.

In the study, soft tissue, hard tissue and total volumes were evaluated in groups to which isotonic saline (control), AuNP, VEGF, AuNP+VEGF and

AuNP+Oligonucleotide+VEGF were injected. Homogeneity of variances were examined with Levene test ($p= 0.216$, $p<0.05$). Homogeneous distributed groups were compared with ANOVA test and Tukey test was used for paired comparisons.

In the histological evaluation of the study when total bone volume that includes soft and hard tissue volumes was considered, a statistically significant increase was seen in VEGF group compared to AuNP+VEGF group ($p<0.05$, $p=0.028$). Likewise, a similar statistically significant increase was recorded when soft tissue volume and total volume were considered, again in VEGF group when it was compared to AuNP group ($p<0.05$, $p=0.046$), ($p<0.05$, $p=0.046$). When soft tissue volume was considered, a statistically significant increase was seen in VEGF group compared to AuNP+Oligonucleotide+VEGF group ($p<0.05$, $p=0.046$).

Results of the study revealed that even though VEGF accelerates bone remodelling, the use of AuNPs for VEGF transfer into the cell with the method of this study, do not increase bone remodelling. It was also found that VEGF had an important role in soft tissue development.

Key Words: Gold nano particles, vascular epithelial growth factor, histomorphometry, rat, maxillary expansion, bone remodelling

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
SUMMARY	IV
İÇİNDEKİLER	VI
ETİK KURUL ONAYI	VIII
KISALTMALAR VE SİMGELER	IX
RESİM LİSTESİ	XI
TABLO LİSTESİ	XIII
ŞEKİL LİSTESİ	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Maksiller Darlık	3
2.1.1. Maksilla Büyüme ve Gelişimi	3
2.1.2. Maksiller Darlığın Görülme Sıklığı	6
2.1.3. Maksiller Darlığın Etyolojisi	7
2.1.4. Maksiller Darlık Tedavisinin Tarihçesi	9
2.1.5. Maksiller Genişletme Tedavisinin Zamanlaması	11
2.1.6. Maksiller Darlığın Tedavisi	13
2.1.7. Hızlı Maksiller Genişletmenin Kraniofasial Yapılar, Çevre Yapılar ve Dişler Üzerine Etkileri, Oluşan Kuvvetler ve Dağılımları	16
2.1.8. Maksiller Darlık Tedavisi Sonrası Retansiyon ve Stabilite	20
2.2. Deneysel Ortodontik Kuvvet ve Deney Hayvanı Olarak Sıçan Kullanılması	23
2.3. Kemik Dokusu	24
2.3.1. Kemik Hücreleri	24
2.3.2. Kemik Gelişimi	27
2.3.3. Kemik Remodelingi	28
2.3.4. Kemik Dokusunun Özellikleri	29

2.3.5. Hızlı Maksiller Genişletme İle Oluşan Histolojik Değişimler	31
2.4. Kemik Yapım-Yıkımını Etkileyen Faktörler	33
2.4.1. Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	35
2.4.2. Kemik Metabolizmasında VEGF'in Yeri	43
2.5. Altın Nano Parçacıklar (AuNP)	45
2.5.1. Altın Nano Parçacıkların Tarihçesi	45
2.5.2. Altın Nano Parçacıkların Sentezlenmesi	46
2.5.3. Altın Nano Parçacıkların Spektroskopisi	46
2.5.4. Altın Nano Parçacıkların Hücre İçine Alınması	51
2.5.5. Altın Nano Parçacıkların Biyo-güvenilirliği	53
2.6. Stereolojik İnceleme Yöntemi	55
2.7. Cavalieri İlkesi ile Hacim Hesaplaması	56
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. Gereç	57
3.2. Yöntem	60
3.2.1. AuNP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu	60
3.2.2. AuNP'lerin Yüzeylerinin Oligonükleotid (ODN) ile İşlevselleştirilmesi ve VEGF Yüklenmesi	62
3.2.3. Oligonükleotid-AuNP'lerin <i>In-Vitro</i> Sitotoksitesi	64
3.2.4. Hayvan Deneyi	65
3.2.5. Histolojik Araştırma	68
3.3. İstatistiksel Yöntem	70
4. BULGULAR	71
4.1. Fiziko-Kimyasal Bulgular	71
4.2. Biyolojik Bulgular	73
4.3. Histomorfometrik Bulgular	74
4.4. Histopatolojik Bulgular	95
4.4.1. Histopatolojik Değerlendirme	98
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇLAR	109
7. KAYNAKLAR	111
8. ÖZGEÇMİŞ	131

ETİK KURUL ONAYI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU (YÜDHEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13.01.2012	235	12.11.2011 tarihli yazı	Doç.Dr.Fulya ÖZDEMİR

'Sıçanlarda Hızlı Üst Çene Genişletmesi Sonrası Vasküler Epiteyal Büyüme Faktörünün Nano Taşıyıcılarla Uygulanması ve Üst Çene Sutural Bölgesinde Oluşan Değişikliklerin İncelenmesi' başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	KATILMADI
Üye	Yrd. Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Hatice ÖZTÜRK	
Üye	Semra TECÜMEN	KATILMADI

KISALTMA VE SİMGELER

µm: Mikrometre

°C: Santigrad Derece

3B: Üç Boyutlu

ALP: Alkalın Fosfataz

Ang: Anjiyopoetin

Å: Angstrom

AuNP: Altın Nano Parçacık

BT: Bilgisayarlı Tomografi

cc: Santimetre Küp

DLS: Dinamik Işık Saçılımı (*Dynamic Light Scattering*)

DO: Distraksiyon Osteogenezi

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (*Epidermal Growth Factor*)

FEM: Sonlu Eleman Analizi (*Finite Element Method*)

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü (*Fibroblast Growth Factor*)

g: Gram

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü (*Hepatocyte Growth Factor*)

HIF: Hipoksiye Bağlı Transkripsiyon Faktörü (*Hypoxia-inducible Transcription Factors*)

HSPG: Heparan Sülfat Proteoglikan

Ibs: Pound

IL: İnterlökin

İ.M.: İntra Musküler

Kg: Kilogram

KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü (*Keratinocyte Growth Factor*)

mg: Miligram

ml: Mililitre

MR: Manyetik Rezonans

MSC: Mezenkimal Kök Hücre (*Mesenchymal stem cell*)

nm: Nanometre
NOS: Nitrik Oksit Sentetaz (*Nitric oxide Synthase*).
Np-1, NRP: Nörofilin-1
ODN: Oligonükleotid
Oz: Ons
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (*Platelet Derived Growth Factor*)
PDL: Periodontal Ligament
PIGF: Plazental Büyüme Faktörü (*Placental Growth Factor*)
RANK: Nüklear Faktör κ B Reseptör Aktivatörü
RANKL: Nüklear Faktör Kappa β Reseptör Aktivatörü Ligantı
RME: Hızlı Üst Çene Genişletmesi (*Rapid Maxillary Expansion*)
RTK: Tirozin-kinaz Reseptörleri
SH: Tiyol
ssDNA: Tek sarmallı DNA (*single stranded DNA*)
TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TGF: Transforming Büyüme Faktörü (*Transforming Growth Factor*)
TME: Temporo-mandibular Eklem
UV/Vis: Morötesi ışık spektrofotometresi (*Ultraviolet Visible Spectrophotometry*)
VDF: Vasküler Permeabilite Faktörü (*Vascular Permeability Factor*)
VEGF: Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü (*Vascular Epithelial Growth Factor*)
VEGFR-1, Flt-1: Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-1
VEGFR-2, Flk-1, KDR: Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
VEGFR-3, Flt-4: Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-3

RESİM LİSTESİ

- Resim 2.1:** Reseptör-VEGF etkileşimi ve VEGF reseptörünün hücre içi döngüsü
- Resim 2.2:** Parçacıkların hareket hızları ile boyutları arasındaki ilişki
- Resim 2.3:** Solüsyondaki parçacıkların polariteleri ve hidrodinamik çapları arasındaki ilişki
- Resim 2.4:** Solüsyona gönderilen lazer ışığının parçacıklara çarparak saçılması ve dedektör tarafından algılanması
- Resim 2.5:** Hidrodinamik çap hesabı ve Stokes-Einstein Denklemi
- Resim 2.6:** Zetapotansiyeli ile pH arasındaki ilişki ve İzoelektrik Nokta
- Resim 2.7:** Henry Denklemi
- Resim 3.1:** Sıçanların yerleştirildiği kafesler
- Resim 3.2:** Sıçan kulağının kesilmesi
- Resim 3.3:** Rekombinant Sıçan VEGF
- Resim 3.4:** AuNP'lerin TEM görüntüsü
- Resim 3.5:** 13 nm boyutundaki AuNP'lere Oligonükleotid bağlanması
- Resim 3.6a:** Anestezi uygulaması
- Resim 3.6b:** Sıçan mandibulasının ekartasyonu
- Resim 3.7:** Sıçan dişlerine delik açılması
- Resim 3.8:** Sıçanların dişlerine heliksli genişletme aygıtı yerleştirilmesi
- Resim 3.9:** Palatal mukozanın altına enjeksiyon
- Resim 3.10:** Disseke edilmiş sıçan maksillası
- Resim 3.11a:** Parafine gömülmüş maksilla
- Resim 3.11b:** Kesit alınmış parafin blok
- Resim 3.12:** Poly L lysin kaplı lamlara aktarılmış ve Hematoksilen Eosin ile boyanmış kesitler
- Resim 4.1:** Tüm grupların karşılaştırıldığı kesici diş bölgesindeki alveolar kemiğin histolojik görünümü.
- Resim 4.2:** Tüm grupların karşılaştırıldığı molar diş bölgesindeki alveolar kemiğin histolojik görünümü.

Resim 4.3: Tüm grupların karşılaştırıldığı palatal bölgedeki kemiğin histolojik görünümü.

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Büyüme Faktörleri

Tablo 2.2: VEGF'nin Tıp Alanında Kullanımı

Tablo2.3: Büyüme Faktörlerinin Fonksiyonları

Tablo 2.4: VEGF ve Reseptörlerinin Kaynağı ve Etkileri

Tablo 2.5: Altın Nano Parçacıkların *In-Vivo* Toksikitesi Özet Tablosu

Tablo 4.1: AuNP ve konjugantlarının Zeta-Potansiyel Değerleri

Tablo 4.2: Deney ve kontrol gruplarındaki sıçanların deney süresince ağırlıklarının değişimi

Tablo 4.3: Üst çene kemiğinde farklı gruplarda gözlenen ortalama hacim ve standart hata payı oranları ANOVA analizi bulguları

Tablo 4.4: İkili gruplarda karşılaştırılan kemik ve yumuşak doku değişimlerinin Tukey analizi ile belirlenen p değerleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: AuNP'lerin UV/Vis spektrumu

Şekil 3.2: Sentezlenen AuNP'lerin hidrodinamik çapı

Şekil 3.3: Enjeksiyon programı

Şekil 4.1: AuNP'lerin ODN ile işlevselleştirilmesi ve VEGF ile yüklenmeleriyle Zetapotansiyel değişimi

Şekil 4.2: AuNP, AuNP-ODN ve AuNP-ODN+VEGF'nin UV/Vis spektrumları

Şekil 4.3: AuNP'lerin DLS analizi ve AuNP-ODN konjugasyonuna VEGF yüklenmesinin 1. ve 2. gününün stabilitesi

Şekil 4.4: AuNP, VEGF, AuNP+VEGF ve AuNP-ODN+VEGF'lerin 22 µg/mL AuNP konsantrasyonunda 24, 48 ve 72 saat osteoblast hücreleri ile muamele edilmesi ile elde edilen toksisite değerlendirmesi

Şekil 4.5: Kontrol ve AuNP grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.6: Kontrol ve VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.7: Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.8: Kontrol ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.9: AuNP ve VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.10: AuNP ve AuNP+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.11: AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.12: VEGF ve AuNP+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.13: VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.14: AuNP+VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırılması

Şekil 4.15: Kontrol ve AuNP grupları arası total hacmin karşılaştırılması

Şekil 4.16: Kontrol ve VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırılması

Şekil 4.17: Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırılması

Şekil 4.18: Kontrol ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.19: AuNP ve VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.20: AuNP ve AuNP+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.21: AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.22: VEGF ve AuNP+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.23: VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.24: AuNP+VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Şekil 4.25: Kontrol ve AuNP grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.26: Kontrol ve VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.27: Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.28: Kontrol ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.29: AuNP ve VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.30: AuNP ve AuNP+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.31: AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.32: VEGF ve AuNP+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.33: VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.34: AuNP+VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Şekil 4.35: AuNP ve VEGF grupları arası yumuşak doku hacminin karşılaştırması

Şekil 4.36: VEGF ve AuNP-Oligonükleotid-VEGF grupları arası yumuşak doku hacmi karşılaştırması

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ağız içi yapılardan biri olan damak, birbirlerine palatal sütür ile temas eden palatal kemiklerden oluşmaktadır. Bazen palatal kemikler büyüme gelişim sürecinde alt çeneye göre daha dar kalıp kapanış sorunlarına neden olabilmektedir. Palatal darlığa bağlı kapanış sorunları, çoğu zaman gelişim dönemindeki hastaların üst çenelerinin ortopedik apareylerle genişletilmesi ile düzeltilmektedir (1). Bu işlemle birlikte arka dişlerin bulunduğu iki kemik parçası birbirlerinden uzaklaşırken suturda aktif kemik yapımı başlamaktadır (2).

Hızlı üst çene genişletmesinin kalıcı ortopedik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Ancak retansiyon periyodu sonrasında bu ortopedik etki, kemiğin metabolizması, oluşacak streslerin yönü, suturda oluşan kemiğin kalitesi ve bu kemiğin oluşma hızı gibi birçok faktörlere bağlı olarak nüks eğilimi gösterir ki, bu geri dönüş % 90 oranlarında olabilmektedir (1, 3). Bu nedenle genişletilmiş üst çenenin kısa sürede nüksünü; yani palatal kemiklerin birbirine yaklaşmasını engellemek amacıyla uzun süre retansiyon sağlamak gerekmektedir (4). Ancak genişletme amaçlı uygulanan yüksek kuvvetlerin uzun retansiyon süreleri boyunca uygulanmaya devam etmeleri istenmeyen diş hareketlerine sebep olmaktadır (5).

Günümüzde yapılan araştırmalar ile nanomateryaller bilimin birçok alanında kullanılan materyaller haline gelmektedir. Altın nano-parçacıkların (AuNP) bu alanlarda kullanımına olanak sağlayan toksik olmama özelliği dışında, optik ve elektronik özellikleri, yüksek stabiliteleri ve biyolojik uyumlulukları, kolay yüzey işlevselleştirilebilmesi gibi özellikleri bu nano-boyutlu parçacıklara artan bir ilgi sağlamıştır (6).

Bu çalışmada ayrıca, AuNP'lerin yüzeyi bir ucu tiyol içeren bir aracı moleküle bağlanmış 20-baz uzunluğunda bir oligonükleotit ile kaplanmış ve pozitif yüzey yüküne sahip VEGF proteinin, negatif yüzey yüklü Oligo-AuNP'ların yüzeyine fiziksel olarak

tutunmaları sağlanmıştır. Altın nano parçacıkların işlevselleştirilmesi, tiyol (-SH) grubu taşıyan herhangi bir organik veya biyolojik kökenli bir molekül ile olabilmektedir; çünkü altın tiyol grubu ile çok iyi bağ yapma özelliğine sahiptir. Tiyol grubu olan bir molekül doğrudan AuNP'lere bağlanabilmektedir (7).

Bu araştırmanın amacı, polianyonik tek sarmallı DNA (oligonükleotid) ile kimyasal olarak kaplanmış altın nano-parçacıklara (AuNP) Vasküler Epitelial Büyüme Faktörü'nün (VEGF) elektrostatik olarak bağlanması ile elde edilen kimyasal yapının, AuNP'lerin, AuNP+VEGF karışımının, VEGF'nin ve serum fizyolojinin (kontrol) üst çenesi genişletilmiş Wistar cinsi sıçanların palatinal mukozasının altına enjeksiyonunun, maksiller sutural bölgede neden olduğu hücresel değişikliklerin histomorfometrik olarak incelenmesidir. Kemik remodelingini hızlandırmak amacıyla yapılan çalışmalarda VEGF kullanılmıştır (8- 10) . Bu proteinin bağ dokusunun yapım-yıkım döngüsünde etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ortaya atılan hipoteze göre VEGF proteininin hızlı üst çene genişletmesi (RME) sonrası lokal yeni kemik oluşum hızını, yeni oluşan damarlar vasıtasıyla artabileceği ve gerekli retansiyon süresini kısaltılabileceği düşünülmektedir. Bu proteinlerin hücre içerisine alınmalarının zor olması nedeniyle *in-vivo* çalışmalarda sitotoksik olmadığı gözlenmiş bir nano-materyal olan AuNP'ler VEGF proteininin hücre içerisine alınmasında taşıyıcı olup, hücre içerisine alınmasını kolaylaştırmaları sayesinde VEGF'nin etkisini arttırılabileceği düşünülmektedir. Araştırma sonucunda elde edilecek verilerin bu konuya ilişkin ileriki dönemlerde yapılacak klinik çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Maksiller Darlık

Maksiller yetersizlik dar palatal kaide ile karakterizedir. Posterior çapraz kapanış, üst molar dişlerin bukko-palatal konumlarına göre tanımlanmaktadır ve unilateral ve bilateral olarak ikiye ayrılmaktadır. Üst molar dişlerin bukkal tüberküllerinin normalden daha palatalde olması; dolayısıyla alt molar dişlerle ilişkilerinin ideal olmaması posterior çapraz kapanış olarak tanımlanmaktadır. Posterior çapraz kapanışın oluşum nedeni dental ya da iskeletsel kaynaklı olabilmektedir. Posterior çapraz kapanış, palatal genişliğin yeterli olması halinde dahi dental bozukluk sebebi ile görülebilmektedir (11).

Dişsel posterior çapraz kapanış, diş kavislerinde darlık olmaksızın dişlerin sadece palatinal eğilmesiyle karakterizedir. Bu, tek bir diş olabileceği gibi bir diş grubunu da kapsayabilmektedir. Dişsel posterior çapraz kapanış çoğu kez lokal faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır (12).

İskeletsel posterior çapraz kapanışta ise, maksilla ve mandibula arasındaki transversal yön uyumsuzluğunun nedeni çoğunlukla maksillanın çift veya tek taraflı olarak daralmasıdır. Maksillada apikal kemik kaidesi yetersizdir. Posterior çapraz kapanış, maksillanın normal gelişip mandibulanın aşırı gelişmesiyle de ortaya çıkabilmektedir (12- 14).

2.1.1. Maksilla Büyüme ve Gelişimi

Büyüme ve gelişim özellikle genetik faktörlere bağlı olarak gerçekleşir. Genetik faktörlerin dışında çevresel faktörler, beslenme, fiziksel aktivite ve çeşitli hastalıklar da

etkilidir. Bu faktörlerden ayrı olarak kraniyo-fasiyal gelişimin nasıl gerçekleştiğiyle ilgili üç temel teori vardır. Bu teoriler sırasıyla;

- i. İskelet büyüme gelişimine kemik büyüme mekanizması karar verir.
- ii. İskelet büyüme gelişimine kıkırdak iç mekanizmaları karar verir.
- iii. İskelet büyüme gelişimine kemik yapının içinde bulunduğu yumuşak doku matriksi karar verir; dolayısıyla kemiksel ve kıkırdaksal mekanizmalar ikincil etkili faktörlerdir.

Teoriler arasındaki temel fark; genetik ekspresyon bölgesinin farklılığıdır. Büyüme merkezleri, genetik kontrol altında çevresel uyarılardan bağımsız büyüme bölgeleridir. Büyüme yerleri ise büyümenin gerçekleştiği bölgelerdir. Büyüme merkezleri aynı zamanda birer büyüme yeridirler; ancak tersi doğru değildir (12).

Periosteal dokular ve suturlar, kraniyo-fasiyal gelişimin esas belirleyici büyüme merkezleri değildir; çünkü:

- i. Sutural alandaki doku başka bir bölgeye transplante edildiği zaman doku büyüme devam etmemektedir.
- ii. Kranial veya fasiyal kemikler suturlarda gerilme olacak şekilde birbirinden uzaklaştırılırlarsa sutural bölgede yeni kemik oluşumu gözlemlenir. Aynı zamanda sutural bölgede sıkışma gerçekleşirse de yeni kemik oluşumu engellenmektedir.

Uzun kemiklerin epifizyal plakları, kranial kaidedeki sfeno-okspital sinkondrozisteki kıkırdak, nazal septal kıkırdak başka bir bölgeye transplante edildiği zaman büyüme devam etmektedirler. Buna karşılık mandibular kondil kıkırdağı ise transplante edildiği zaman çok az büyüme göstermektedir; dolayısıyla büyüme merkezi olarak kabul edilmez. Erken dönemde nazal septal kıkırdağın cerrahi olarak çıkarılması ise orta yüz gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (12).

Moss'un 1960'lı yıllarda tanımladığı "Fonksiyonel Matriks Teorisi", kraniyofasiyal bölge iskelet yapısının çevre yumuşak dokuların etkisi altında fonksiyonel ihtiyaçlara ve nörotrofik etkilere uygun olarak geliştiğini savunmaktadır. Fonksiyonel Matriks Teorisi'ne göre maksilla ve mandibulanın büyüme-gelişimi, fonksiyonel ihtiyaçlara bağlı olarak gelişen nazal ve oral kaviteelerin kontrolü altındadır; ancak fonksiyonel ihtiyaçların dokulara büyüme uyarısını nasıl ilettiğine açıklık getirilmemektedir. Ayrıca maksillanın çevre yumuşak dokularının ve nazal septal kırırdağın büyüme gelişiminin, maksillanın aşağı ve öne translasyonunu ne kadar etkilediği bilinmemektedir (12).

Nazo-maksiller bölgenin büyümesi, maksillaya öne translasyon sağlayan kraniyal kaide büyümesinin sağladığı pasif yer değiştirme ve maksiller yapının ve burnun aktif büyümesi ile gerçekleşir (15). Maksilla zarsal kemikleşme ile özellikle postnatal dönemde gelişim gösterir. Kırırdağ replasmanı olmadığı için maksillayı kraniyal kaideye ve kraniuma bağlayan suturlarda kemik apozisyonu ve yüzey remodelingi olur. Kraniyal kaidedeki ve sutural bölgedeki büyümeye bağlı olarak maksilla öne ve aşağıya yer değiştirir. Altı yaşına kadar kraniyal kaidenin uzunluğunun artması maksillanın ileri yönde yer değiştirmesine sebep olur. Yedi yaşından sonra kraniyal kaidenin büyümesi durur; dolayısıyla sutural gelişim, maksillanın öne yer değiştirmesini sağlayan tek mekanizmadır (12). Maksillanın pasif yer değiştirmesi özellikle süt dentisyon döneminde görülür ve nöral büyümenin 7 yaş civarında tamamlanmasıyla maksillanın pasif yer değiştirme miktarı azalır. 7-15 yaş arasında görülen maksillanın ileri yer değiştirmesinin sadece üçte biri pasif yer değiştirme sonucunda gerçekleşir; kalan üçte ikilik büyüme ise çevresel yumuşak dokuların etkisi altında maksiller suturlarda görülen aktif büyümedir (15). Mid-palatal suturlar aynı genişlikte kalırken suturların her iki tarafında kemik apozisyonu olur; böylelikle maksilla genişler. Maksillanın oral kaviteye bakan kısmı maksilla ile birlikte aşağı ve ileri hareket ederken maksillanın nazal kaviteye bakan kısmında kemik rezorpsiyonu gerçekleşir; böylelikle damak kubbesi öne ve aşağıya hareket gerçekleştirir (12).

Maksillanın büyümesi, sırasıyla genişlik, uzunluk ve yükseklik ölçümlerinde tamamlanır. Dental ark perimetresi dahil maksiller genişlik artışı, ergenlik büyüme

atılımından önce tamamlanmaktadır; dolayısı ile maksilla, ergenlik büyüme dönemindeki değişimlerden az etkilenir. Maksiller uzunluk ve yükseklik artışı puberte döneminde de devam etmektedir. Kızlarda, ilk menstürasyondan 2-3 sene sonrası döneme kadar maksilla öne ve aşağıya büyümeye devam etmektedir (15).

Bu bilgilere paralel olarak Björk ve Skieller'in (16), yaptıkları implant çalışmasına göre, median suturdaki büyümenin erişkin döneme kadar sürdüğü görülmüştür. 10-11 yaşından erişkin yaşa kadar posterior implantlar arası mesafe artışının, anterior implantlar arası mesafe artışından yaklaşık 3 kat fazla olduğunu, sonuç olarak; üst çenenin her iki yarısının transversal yönde rotasyona uğradığını belirtmişlerdir. Sutural büyümenin tamamlanması ise ortalama olarak 17 yaşına denk gelmektedir.

Benzer şekilde Melsen (17), insan otopsislerinde yapmış olduğu çalışmada, suturun morfolojik olarak üç dönemde geliştiğini, midpalatal suturun başlangıçta kısa ve Y şeklinde, ikinci dönemde daha dalgalı ve üçüncü dönemde interdigitasyonun, kırık oluşturmada suturu ayıramayacak kadar sıkı olduğunu rapor etmiştir. 13-15 yaşa kadar sert damak boyutundaki artışın transvers suturdaki büyümeye ve damağın arka kenarındaki apozisyona bağlı olduğunu, bu dönemden sonra suturdaki büyümenin tamamlandığını, apozisyonun ise birkaç yıl daha devam ettiğini belirtmiştir.

Bu bilgiler ışığında, yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, 6-11 yaş arasında yan çapraz kapanış görülme sıklığı, 12-17 yaş arasında görülme sıklığından daha az bulunmaktadır (12). Yan çapraz kapanış görülme sıklığı toplumsal farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (18).

2.1.2. Maksiller Darlığın Görülme Sıklığı

Adölesan dönemdeki Danimarka'lı çocuklarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kızlarda (%14) erkeklere (%9,4) oranla daha fazla yan çapraz kapanış

görülmüştür (19). 5-17 yaş aralığında 4724 Kolombiyalı çocuk hastanın incelendiği epidemiyolojik çalışmada çocukların %20'sinde 2mm'den fazla orta hat kayması ile beraber tek taraflı yan çapraz kapanış olduğu tespit edilmiştir (20).

Süt dişlenme döneminde yan çapraz kapanış görülme sıklığı değişik çalışmalarda farklı (%8-12) bulunmaktadır (21, 22). Yan çapraz kapanış görülme sıklığı süt dişlenme döneminde daimi dişlenme dönemine göre daha fazla görülmektedir (%8, %7,2) (21).

2.1.3. Maksiller Darlığın Etyolojisi

Maksiller darlık etyolojisinde ağızsolunumu, süt dişlerinin retansiyonu, çapraşıklık, süt dişlerinde görülen prematür kontaklar, dudak damak yarıkları, parmak emme ve diş/dental ark boyu uyumsuzlukları etkilidir (21).

Moyers (23), ortodontik anomalilerin etyolojisini 7 kategoride incelemektedir:

1. Kalıtım
2. Kaynağı bilinmeyen gelişimsel defektler
3. Travma
4. Fiziksel ajanlar
5. Alışkanlıklar
6. Hastalıklar
7. Kötü beslenme

Maksiller darlığı olan hastalarda nazal obstrüksiyon ile sıklıkla karşılaşılmaktadır; erken dönemde yapılan ortodontik tedaviler ile nazal solunuma geçilebilmektedir ve nazal obstrüksiyon problemi düzelebilmektedir (24). Erken dönem ortodontik tedavi görmemiş ve adenoid yüz tipi gelişmiş hastalarda, nazal enflamasyon veya kronik nazal obstrüksiyon sonucu görülebilen yüksek nazal dirençten dolayı ağız solunumu görülmektedir. Bu durumda mandibulanın saat yönünde rotasyonu, dilin

mandibulada konumlanmasına ve dolayısıyla derin ve V şeklinde dar maksilla, daralmış maksiller dental ark, kısa ve zayıf üst dudak, zayıf ağız çevresi kasları sebep olmaktadır ve tüm bunların sonucunda ağız açık bir postür ortaya çıkmaktadır (12), (25). Nazal tıkanıklığın maksillaya olan etkisini incelemek için deneysel nazal tıkanıklık yaratılan Rhesus maymunlarında, maksiller darlık olduğu gözlenmektedir (26).

Nazal tıkanıklığın dışında, maksiller iskeletsel yapıdaki darlığın bir başka kaynağı olarak da kraniyosinostozdan bahsedilebilir. Sinostoz, suturların erken dönemde kapanması olarak tanımlanmaktadır. Kraniyal sinostoz daha sık rastlanırken, yüz kemiklerindeki suturların erken kapanması daha nadir izlenen bir durumdur. Kokich'in (27) de belirttiği gibi zigomatiko-temporal sutur en geç kapanan suturlardan biridir ve böylece büyüme döneminde oldukça etkilidir.

Fonksiyonel matriks teorisine göre, büyüme fonksiyonel ihtiyaçlara cevaben meydana gelmektedir. Yumuşak dokular büyümekte ve bu büyümeye kemik ve kırık dokular cevap vermektedir (28). Orofasial bölgenin doğru fonksiyon görmesi (solunum, çiğneme ve yutkunma fonksiyonları gibi), çene kemiklerinin doğru büyümesine ve gelişmesine neden olmaktadır (29, 30).

Kalıtım veya uzun süreli emzik / biberon emme ve patolojik ağız solunumu gibi etkenler sonucu gelişen maksiller darlık, erken tedavi edilmezse TME rahatsızlıklarına ve yüzde asimetri gelişimine neden olmaktadır (31). Maksiller darlık sonucu çapraz kapanış tarafında artan kassal aktivite, kraniyofasiyal büyümeyi etkilemekte ve asimetri gelişimine ve normal yüz estetiğinden sapmalara yol açmaktadır (32). Parmak emme, süt dişlenme döneminde ünilateral çapraz kapanışa neden olabilmektedir (33).

Chierici ve ark. (34) maymunların sert damağında ortalama 3 mm genişliğinde yarıklar oluşturmuşlardır. Yumuşak damağın ve burun tabanı mukozasının sağlam bırakıldığı çalışmalarında, normal bir yapının sonradan oluşan anormal çevresel koşullara cevabını incelemişlerdir. Maksilladaki, burun kavitesindeki ve dişlerin konumlarındaki değişimler ile birlikte çapraz kapanış gerçekleştiğini izlemişlerdir.

2.1.4. Maksiller Darlık Tedavisinin Tarihçesi

Emerson C. Angell'in 1860 yılında yayınlanan makalesinde, araştırmacı küçükazılar arasına uyguladığı çift yönlü bir vida sayesinde midpalatal suturun açılabilceğini öne sürmüştür. Angell, apareyini bir tarafta 1. ve 2. küçük azılardan, diğer tarafta ise yalnızca 2. küçük azıdan destek alacak şekilde, 14 yaşında bir kız çocuğuna uygulamıştır. Hastaya vidayı günde iki kez çevirmesini söylemiştir. Angell, 2 haftalık genişletme sonrası üst çenenin çok fazla genişlediğini, üst kesiciler arasında oluşan aralığın maksiller kemiklerin birbirinden ayrıldığına işaret ettiğini ve daha önce çapraz kapanışta olan sol yan kesicinin tamamıyla öne geldiğini rapor etmiştir. O tarihlerde x-ışını daha bulunmadığından bu görüşü oldukça eleştirilmiş ve kuşkuyla karşılanmıştır (35).

Bu fikir daha sonra Farrar (1888), Goddard (1893), G.V. Black (1893) ve Monson (1898) tarafından da ele alınmasına rağmen, sonraki elli yılda fazla popülerlik kazanmamıştır. Büyüme ve gelişimde, fonksiyonel kavramın kabul görmesi bu durumda etkili olmuştur (35).

Brown (1903) üst çene genişletmesi ile nazal septumun ve nazal pasajların etkilendiğini belirtmesine rağmen, teknik yetersizliklerden dolayı bu görüşünü radyolojik olarak destekleyememiştir. Landsberger (1910) de bukkal dişlere uygulanan lateral kuvvetler sonucu midpalatal suturdaki açılımı ilk kez oklüzal radyografide göstermeyi başarmıştır. 1911'den 1929'a kadar çeşitli araştırmacılar bu tekniği kullanmalarına rağmen hızlı üst çene genişletmesi 1961 yılına kadar fazla popülerlik kazanmamıştır (36).

Derichsweiler, genişletme öncesi ve sonrası aldığı frontal radyografilerle, genişletme sonucu iki maksiler kemiğin birbirinden ayrıldığını göstermiştir (36).

Graber, 1940 yılında hızlı maksiller genişletme aygıtını dudak-damak yarıklı hastaların tedavisinde kullanmaya başlamıştır (5).

Haas, 1961'de kendi adını verdiği sabit, doku destekli apareyini tanıtmıştır. Aygıt, üst 1. büyük azılar ve üst 1. küçük azılardan oluşan 4 bant, her bandın bukkal ve lingual yüzeylerine lehimlenmiş kalın tellerden oluşmaktadır. Lingual teller palatine doğru uzanıp, akrilik plak içine gömülmüş, genişletme vidasının lateral kenarları akrilik içinde yer alacak şekilde vida damağın orta hattı boyunca yerleştirilmiştir. Araştırmacı, aygıtın akrilik plağı sebebiyle, dişlerde daha az devrilmeye neden olduğunu ve böylece kuvvetin yalnızca dişler üzerine değil, apareyin kapladığı yumuşak ve sert dokulara da yayıldığını, maksillada gövdesel hareket meydana geldiğini ileri sürmüştür (14, 37).

Ricketts, 1960'ta, üst daimi 1. büyük azıları bantlayarak ve bu bantlara 1 mm'lik yuvarlak çelik telden hazırlanmış, 4 heliksli, W şeklinde tel lehimleyerek Quad-helix adını verdiği aygıtla üst çeneyi genişletmiştir. Bu aygıtın hafif, devamlı kuvvetler ilettiği ve özellikle süt ve karma dentisyonlarda uygulandığında iskeletsel etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Aygıt ile ön bölgede arka bölgeye göre daha fazla hareket elde edilebildiğinden, dudak-damak yarıklı hastalarda avantajlı olduğu bildirilmiştir (38, 39).

Wertz (40), yaptığı çalışmada, nazal stenozu olan hastalarda maksiller genişletmenin nazal hava akışını artırdığını bulmuştur. 1970'lerde yaptıkları çalışmalarla Wertz (41), Melsen (17), Persson ve Thilander (42), iskeletsel matürasyonla efektif sutural açılımın ilişkisini sorgulamışlardır.

Biederman ve Chem, maksiller genişletme ile sınıf III vakaların tedavilerini anlatan bir çalışma yayınlamışlar ve Haas apareyinde olduğu gibi akrilik bir kaide taşımayan, bu açıdan daha hijyenik olan Hyrax aygıtını tanıtmışlardır (43, 44).

Subtelny (45), dik yönün artmış olduğu vakalarda ısırma plağı eklenmiş hızlı genişletme aygıtı ile diş kronlarının daha iyi kavrandığını, büyük azı dişlerinde daha az

devrilme olduğunu ve bu apareyin, diş kökleri vasıtasıyla daha fazla kuvveti nazomaksiller komplekse ilettiğini bildirmiştir.

Timms (46), üst santral dişler dışında tüm dişlerin oklüzal yüzeylerini örten iki ayrı krom kobalt plak ve bir vidadan oluşan “Cap Splint” apareyini tanıtmıştır.

Howe (47), akrilik, yapıştırılabilir palatal genişletme aygıtı olarak isimlendirdiği aparey ile tedavi ettiği bir vakayı sunmuştur.

Arnett (48), maksiller arkta genişleme sağlamak amacıyla, “Nikel titanyum genişletme aygıtı”nı geliştirmiştir. Araştırmacı, bu aygıtın anterior ve posterior bölgede transversal yönde eşit palatal genişletme sağladığını, aynı zamanda hem hasta açısından kolay tolere edilebildiğini, hem de hekim açısından uygulama kolaylığı sağladığını bildirmiştir.

Darendeliler ve ark. (49), 250-500 g’lık devamlı kuvvet uygulayan samarium kobalt mıknatıslar ile maksiller genişletme yapmışlardır. Araştırmacılar, hafif ama devamlı kuvvetler ile daha kalıcı sonuçlar elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Toroğlu ve ark. (50), gerçek tek taraflı maksiller darlık vakalarında uyguladıkları AMEX aygıtı ile dişlerde çapraz kapanış olan tarafta genişleme kaydettiklerini ve bu aygıtın tek taraflı arka çapraz kapanışların tedavisinde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

2.1.5. Maksiller Genişletme Tedavisinin Zamanlaması

Izard, kurukafalar üzerinde sutur yapısı ile ilgili çalışmıştır. Midpalatal suturunun 16 yaş civarında kapanmaya başladığını ve 25 yaş civarı ossifiye olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle genişletmenin 7-12 yaşları arasında başlaması gerektiğini belirtmiştir (51).

Hasta yaşının artması ve iskeletsel genişletmeye direncin artışı arasında direkt bir ilişki olduğu ve bunun da en erken 12-13 yaşlarında görülen maksiller artikulasyonlardaki mekanik kilitlenmelerle bağlantılı olduğu bulunmuştur (52- 54).

İnsan otopsi materyali üzerinde yapılan çalışmalarda, palatal suturun juvenil dönemde kapanabildiği; ancak bunun daha geç de gerçekleşebileceği belirtilmiştir. Suturun 15 yaşındaki bir kız çocuğunda kapanabildiği; buna rağmen 27 yaşındaki bir kadında hala kapanmayabileceği gösterilmiştir. Erişkin bireylerde kuvvet uygulanarak suturda açılma sağlanabileceği, 25 yaşına kadar hızlı üst çene genişletmesi'nin denenebileceği; çünkü bu yaşa kadar midpalatal suturun %5 ihtimalle kapanmadığı bildirilmiştir. Bireysel değişikliklerin ve cinsiyetin bu yaş sınırının değişmesinde rol oynayabileceği vurgulanmıştır (42).

Da Silva ve ark. (18), maksiller darlığın, süt dişlenme dönemi de dahil olabildiğince erken dönemde düzeltilmesi gerektiğini savunmaktadırlar. Buna neden olarak, maksillanın yüz kemikleriyle olan bağlantısının yaşla birlikte daha rijit hale gelmesi, erken dönem genişletmede hareketin daha kolay elde edilmesi ve hastaların ağrıdan daha az şikayet etmelerini göstermektedirler.

McNamara (55), genç hastalarda hızlı üst çene genişletmesinin daha etkili olduğunu, genişletmenin daha kolay gerçekleştiğini ve sonuçların tahmin edilebilir olduğunu belirtmiştir. Bunun nedeninin de genç bireylerdeki sutur yapısı olduğunu bildirmiştir.

Hızlı üst çene genişletmesinin süt, karışık ve sürekli dişlenme dönemindeki etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada erken yaşlarda oluşan ortopedik etkinin beklenenin altında kaldığını, tedavinin erken karışık dişlenme dönemine kadar bekletilmesinin daha iyi bir alternatif olabileceğini savunulmaktadır (56).

2.1.6. Maksiller Darlığın Tedavisi

Hızlı üst çene genişletmesi (RME) 1960'lı yıllardan beri kullanılmaktadır. RME, üst çene darlığı, çapraz kapanış veya dental çapraşıklık olgularında dental ark perimetresinin genişletilmesinde kullanılmaktadır (57).

Hayvanlarda yapılan histolojik çalışmalarda RME'nin sutural alanda ve sutural bölgedeki olgunlaşmamış kemik dokusunda hücresel aktiviteyi arttırdığı görülmüştür (58). Yapılan sintigrafik çalışmalarda RME'nin maksiller, zigomatik, sfenoid, nazal kemiklerde ve midpalatal suturda metabolik aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur (59).

9-10 yaşlarına kadar uygulanacak yavaş veya hızlı üst çene genişletme aygıtları mid-palatal suturda benzer etkiler göstererek intermolar mesafenin artmasına ve sutural açılmaya neden olabilmektedir (60). 15 yaşına kadar sutural açılmanın gerçekleşme oranı neredeyse %100'dür (61).

Dental arkın genişletilmesinde çeşitli metodlar vardır. İskeletsel etki elde edebilmek için uygulanan kuvvetin etkisinin direk olarak palatal sutura olması gerekmektedir. Ergenlik öncesi çocuklarda palatal genişletme için üç uygulama vardır:

1. Orta hattında kalın yayı olan parçalı hareketli plak
2. W-ark veya Quad-Heliks tasarımı olan lingual ark
3. Bantlı veya simante edilebilen Hyrax vidalı, dişlere sabit, palatal genişletme aygıtı

Hareketli plaklar ve lingual arklar yavaş genişletme sağlamaktadırlar. Sabit genişletme aygıtları ise hızlı (*rapid* - günde 0,5mm veya daha fazla genişletme), kısmi hızlı (*semi-rapid* - günde 0,25mm genişletme) ya da yavaş (*slow* - haftada 1mm genişletme) genişletme sağlayacak şekilde aktive edilebilirler (62).

15-18 yaşlarına kadar maksiller genişlik artışı devam edebilmektedir. Artan yaş ile beraber midpalatal suturda sıkı bağlantılar oluşur; dolayısıyla yaş küçüldükçe palatal genişleme daha düşük kuvvetlerle sağlanabilmektedir. (62).

Erken karışık dişlenme döneminde her üç genişletme aygıtı da hem iskeletsel hem de dental değişiklikler oluşturur. Ancak hareketli aygıtın aktivasyonu yavaş olduğu için tedavi çok uzun sürmektedir. Haftada 1mm genişleme sağlayan ve dişlere yaklaşık 2 Ibs kuvvet uygulayan yavaş genişletme aygıtlarının gerçekleştirdiği genişleme radyografilerle veya orta hat diastemasıyla takip edilemez; çünkü yeni kemik yapım hızı ile genişleme hızı birbirine çok yakındır. Erken süt dişlenme veya süt dişlenme dönemindeki hastalarda aktif lingual ark ile yavaş genişletme tedavisi önerilmektedir. Geç karışık dişlenme döneminde midpalatal suturda genişletme sağlamak için yüksek kuvvetler uygulamak gerekmektedir; dolayısıyla bu dönemde mümkün olan en fazla sayıda diştan destek alınır. Hızlı üst çene genişletmesinde 0,5mm'lik vida aktivasyonu ile 10-20 Ibs arası kuvvet dişler vasıtasıyla palatinal sutura iletilmiş olur. Midpalatal sutur kemik spikulalarında mikro-kırıklar meydana gelir. Geç karışık dişlenme döneminde hızlı üst çene genişletmesi ile elde edilen inter-kanin ark mesafesi artışı yavaş genişletme ile elde edilen artıştan daha fazla bulunmuştur (62).

Ergenlik döneminde, ancak fazla kuvvet uygulayabilen vidalı apareyler yardımı ile bölgesel kenetlenmesi gerçekleşmiş suturda mikro kırıklar oluşturarak genişleme sağlanabilmektedir (60). Ergenlik sonrası yaşın artmasıyla beraber sutural bölgede gerçekleşen kenetlenme artacağı için sutural genişletme sağlanamayabilmektedir. Bu durumda cerrahi destekli palatal genişletme uygulanmaktadır (60). Ergenlik döneminde mid-palatal sutur genişletmesi üç farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir:

1. Maksiller posterior dişlere yerleştirilen vidalı aparey yardımı ile günde 0,5-1 mm genişletmenin sağlandığı hızlı genişletme
2. Maksiller posterior dişlere yerleştirilen vidalı aparey yardımı ile haftada 1 mm genişletmenin sağlandığı yavaş genişletme

3. Kemikten destek alan implant veya kemik vidaları aracılığıyla yapılan ve kuvvetin direk kemiğe iletiildiği implant destekli genişletme

Üst çene genişletmesinin amacı genişlemenin iskeletsel olarak gerçekleşmesidir. Hızlı üst çene genişletmesi sonrası mid-palatal suturda oluşturulan boşluğa doku sıvıları ve kanın dolması beklenir. Sutural bölgede bu yeni kemik dokusunun oluşumu üç ayı bulmaktadır. Genişletme apareyi çıkartıldıktan sonra iskeletsel nüks bir miktar görülmektedir; ancak aynı zamanda dişler de hareket etmektedir. Dolayısıyla geçen zaman zarfında genişletmenin iskeletsel sonucu azalıp dental değişiklikler artmaktadır (60).

Yavaş üst çene genişletmesinin hızlı genişletmeden farkı; mid-palatal sutur dokularının genişletme hızına uyum sağlayabilmesi, sutural alanda kanamanın az olması, orta hat diastemanın hiç oluşmaması ve fizyolojik cevabın daha fazla olmasıdır. İskeletsel ve dental değişiklikler açısından bakıldığında sonuçlar benzer bulunmuştur.

İmplant destekli üst çene genişletmesinde, genişlemenin tamamına yakını iskeletsel değişiklikler ile elde edilmektedir (60).

İskeletsel maksiller darlıkta dar damak kubbesi görülür ve midpalatal suturun transversal olarak genişletilmesi ile tedavi edilir. Transversal genişletme, posterior çapraz kapanışı düzeltir, maksillayı öne alır, dental ark perimetresini arttırır ve daimi diş germlerinin yerini değiştirir (62).

Thourne ve Hugo (1960), hızlı üst çene genişletmesi ile maksiller apikal kaidede, nazal kavite genişliklerinde ve nazal havayolunda önemli artışlar bildirmişlerdir (63).

Isaacson'un Minne Expander aygıtı, daimi 1. büyükazı bantları arasına yerleşmiş kuvvetli bir zemberekten oluşmaktadır. Zembereğin sıkıştırılması ve apareyin

aktivasyonu vida somunu çevrilerek sağlanmaktadır. Dar maksiler arklara adaptasyonunun sağlanabilmesi için tüp, zemberek veya çubuk kısaltılabilmektedir. İçinde zemberek bulunan vidalar ve Minne Expander eğer pasif hale getirilmezlerse genişletme fazı bittikten sonra bile kuvvet iletmeye devam ederler (13).

Harberson ve Myers (64), süt ve karışık dişlenme döneminde 'W' apareyi kullanarak posterior bölgede çapraz kapanışın düzelmesi sırasında midpalatal suturda radyografik olarak açılma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

2.1.7. Hızlı Üst Çene Genişletmesinin Kraniofasiyal Yapılar, Çevre Yapılar ve Dişler Üzerine Etkileri, Oluşan Kuvvetler ve Dağılımları

Hızlı üst çene genişletmesi, dişlere ve alveol yapılara uygulanan kuvvetlerin, ortodontik diş hareketi için gerekli olan kuvvet sınırlarını aşması ile meydana gelmektedir. Uygulanan ortopedik kuvvet sonucunda midpalatal sutur açılmaktadır. Aparey periodontal ligamente baskı yapmakta, alveolar yapıları ve destek dişleri bir miktar eğmektedir (37). Bu sutural açılma sırasında maksiller parçalar hem horizontal hem de frontal düzlemde rotasyonlarla birlikte hem aşağı hem de öne yer değiştirmektedir. Yatay düzlemde maksillanın hareketi, oklüzal radyografilerle kolayca tespit edilebilmektedir. Maksiller parçalar tabanı fasiyal yapıların direncinin daha az olduğu anteriorda olan, radyolüsent üçgen bir saha oluşturacak şekilde midpalatal sutur boyunca birbirinden ayrılmaktadır (14, 37, 41, 65, 66).

Oklüzal filmler incelendiğinde suturdaki açılmanın, palatin kemiklerin horizontal plaklarına kadar uzandığı gözlenmiştir (41).

Frontalden bakıldığında, maksiller suturun, superoinferior yönde de paralel açılmadığı gözlenmektedir. Açılma, tabanı ağız tavanında, rotasyon merkezi frontonazal suturda olacak şekilde piramidal bir yapıda oluşmaktadır.

Ekström ve ark. (65), yavaş genişletme ile midpalatal suturun açılmasını takiben birinci ay içinde mineral yoğunluğunun suturda hızla arttığını, komşu kemiklerde hızla azaldığını ve üç ay içinde mineral yoğunluğunun ilk seviyesine dönmüş olacağını bulmuşlardır.

Çoğu hızlı üst çene genişletmesi yönteminde kuvvet bir vida aracılığı ile elde edilmektedir. Vidanın her açılması ile laterale doğru bir ayrılma ve hareket gözlenmektedir. Aynı miktarlardaki aktivasyonlar, gerek farklı hastalarda gerekse aynı hastada, tedavinin farklı safhalarında, değişen oranlarda kuvvet oluşturmaktadır (67).

Newton'un üçüncü yasasına göre, vidayı çevirmek için harcadığımız kuvvet ölçüsünde etkilenen yapılarda da direnç oluşacaktır. Bu oluşan direnç hastanın yaşına, maksillanın suturlarındaki, özellikle de midpalatal, maksillo-zigomatik, maksillopalatin ve sfenopalatin suturlardaki kemik yoğunluğuna ve ossifikasyon derecesine ve tedavinin safhalarına bağlıdır (67).

Sutur açılırken ve açıldıktan sonra oluşan direnç seviyesinde belirgin bir fark bulunamamaktadır. Araştırmacılar genişletmeye asıl direncin, midpalatal suturdan değil, maksillanın diğer artikülasyonlarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Kemik segmentlerinde relapsı önlemek için aparey ağızdan çıkarılmadan önce tüm kuvvetler elimine edilmelidir (52).

Yüz iskeleti genişletmeye direnç göstermektedir ve tedavi sırasında 16,6-34,8 Ibs (7,5-16 kg) arasında değişen kuvvetler, 6 haftalık retansiyon periyodunda kademeli olarak kaybolmaktadır (68).

Quad-helix ve W zembereği gibi yavaş genişletme apareyleri, birkaç ons ve 2 Ibs arası (28 g-1 kg) kuvvet uygulamaktadır. Bu apareylerin süt ve karışık dişlenme döneminde suturu ayırıcı etkileri vardır (69, 70).

Hicks (54), 2 Ibs'lik kuvvetler uygulayarak haftada 0,4-1,1 mm'lik genişletme hızıyla üst ark genişliğinde tedavi boyunca 3,8-8,7 mm'ye kadar artışlar elde etmiş ve 10-11 yaş hastalarında ark genişliği artışının % 24-30'unun, 14-15 yaşlarında da %16'sının sutural açılmadan kaynaklandığını belirtmiştir.

Midpalatal suturda daha az travma oluşturan yavaş genişletme ile hem daha iyi biyolojik bir uyum oluştuğunu hem de sutural stabilitenin daha iyi olduğu belirtilmiştir. Yavaş genişletme ile destek dişlerde daha az devrilme olmaktadır ve genişletilen segmentlerde rezidüel yükler daha az birikmektedir (52, 71, 72). Sutural bütünlüğün korunması ve dokularda daha az kuvvet birikmesi nedeniyle klinisyenler yavaş genişletme ile relapsın daha az olacağını düşünmüşlerdir (52, 71, 72). Yavaş genişletme ile ayrılmış maksiller segmentlerin üç ay ya da daha kısa süre retansiyonu ile sutural rejenerasyon ve stabilizasyonu sağlanmaktadır (65, 69, 70, 71).

Rhesus maymunlarında hızlı üst çene genişletmesinin lambdoid, parietal, midsagital suturlarda ve sfenooksipital sinkondrosiste disoryantasyona neden olduğu bildirilmiştir. (58).

Sutural açılmaya esas direnç, midpalatal suturdan değil, sfenoid ve zigomatik kemiklerden kaynaklanmaktadır. Maksillanın posteriorunda yer alan sfenoid kemiğin pterygoid plakları, bilateral konumlanmalarına rağmen, aralarında laterale yer değiştirmelerine izin verecek bir sutur yoktur. Palatin kemiklerin piramidal prosesleri, pterygoid plaklarla birbirine bağlanmaktadır. Sfenoid kemiğin pterygoid plaklarının bu kısıtlayıcı etkisi, palatin kemiklerin sagittal düzlemde kayabilmesini önemli ölçüde azaltmaktadır (41).

İskeletsel yapılar rijit yapılarından dolayı genişletme kuvvetlerine ani bir direnç göstermektedirler. Bir diğer önemli faktör de iskeletsel yapıları saran yumuşak doku kompleksidir. Çiğneme kasları, yüz kasları ve fasya kısmen elastik yapıdadır ve genişletme kuvvetleri uygulandığında gerilebilirler; ancak gerilmiş kasların,

ligamentlerin ve fasyanın bu yeni çevreye ne denli uyum sağladıkları ileri araştırmaları gerektirmektedir (13).

Haas, Hyrax, Minne-expander, Quad-helix ve hareketli genişletme aygıtlarının oluşturdukları kuvvetlerin, 3 boyutlu fotoelastik kafatası modeli üzerinde ölçümlerinde Haas, Hyrax ve hareketli vidalı apareylerle en fazla ortopedik kuvvetin oluştuğu, Minne aygıtının en az kuvveti oluşturduğu ama bu kuvvetin bile ortopedik etkisinin olduğu, Quad-helix apareyinin ise ortopedik kuvvetten ziyade ortodontik kuvvetler oluşturduğu bildirilmiştir. Haas, Hyrax, Minne-expander aygıtlarıyla oluşan kuvvetlerin sert damağın ön kısmında odaklandığı, uygulamanın başlangıç etkilerinin santral kesiciler arasındaki alanda görüldüğü ve insiziv foramene doğru yayıldığı gözlemlenmiştir. Aktivasyonlarla beraber stres intermaksiller sutur boyunca palatin kemiklerin birleştiği yere doğru yayılmaktadır. Kuvvetler bu bölgeden zigomatik kemiğe doğru yayılmaktadır ve özellikle zigomatikomaksiller ve zigomatikotemporal suturlar etkilenmektedir. Kuvvetler daha sonra orbitanın medial duvarı, nazal ve lakrimal kemiklerin birleştiği bölgelere ve sfenoid kemiğin pterygoid plaklarına yayılmaktadır (73).

Hızlı üst çene genişletmesinin kraniyofasiyal yapılara biyomekanik etkisi, sonlu eleman analizi (*FEM*) ile incelendiğinde maksillanın 10mm genişletilmesi ile en yüksek stres seviyesinin sfenoid kemiğin pterygoid çıkıntısının kafa kaidesine yakın olan üst kısmında oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca zigomatik kemik, orbitanın dış duvarı, nazal kavite dış duvarı ve maksillanın büyükazı ve kanin bölgelerinde de yüksek streslerin oluştuğu saptanmıştır. Bulgulara dayanarak, genişletmeye direncin midpalatal suturdan ziyade çevre iskelet yapılardan, özellikle de sfenoid kemiğin pterygoid laminalarından kaynaklandığı savunulmaktadır (74). Bununla birlikte maksilla ayrılmaya başladığında zigomatik proseslerin genişletmeye bir miktar direnç gösterdikleri; fakat sutur sisteminin genişletilen yapıların yer değiştirmesine izin verdiği belirtilmiştir. Ayrıca, basınç uygulandığında pterygoid plakların sınırlı miktarda eğildiği ve eğilmeye direncin, plakların çok daha rijit olan kraniyal tabana yakın kısmında belirgin olarak arttığı rapor edilmiştir (74).

2.1.8. Maksiller Darlık Tedavisi Sonrası Retansiyon ve Stabilite

Hızlı üst çene genişletmesi uygulanan olgularda destek alınan doku (37) ve retansiyon süresi (75), hastanın yaşı (76), retansiyon metodu (69) ve çevre yumuşak dokular (37, 41, 68, 75, 77, 78) yapılan genişletmenin nüksü üzerinde etkilidir. Genişletme amacıyla ne kadar kemik desteği kullanılırsa o kadar stabilite artmaktadır; aynı şekilde ne kadar diş desteği kullanılırsa da tedavi sonrası nüks o kadar fazla görülmektedir (37). Hızlı üst çene genişletmesi sonrası retansiyon süreci uzun tutulduğu takdirde yapılan genişletmenin stabil kaldığı görülmüştür (75). Erişkin hastalarda palatal genişletme ile kazanılan artışın çoğu kaybedilmektedir; aksine genç hastalarda nüks daha az görülmektedir (76). Nüksün daha az görülebilmesi için retansiyon aygıtlarından faydalanılır. Hicks'e göre retansiyon yapılmazsa, relaps %45 oranında, sabit retansiyonla %10-23 arası ve hareketli apareylerle %22-25 arasında olmaktadır (69). Haas tipi genişletme apareyi uyguladıktan sonra alınan uzun dönem kayıtlarıyla, hızlı üst çene genişletmesi ve onu takip eden edgewise uygulaması sonucu onuncu yılda dahi maksiller genişlik, maksiler kesici apeks mesafesi ve maksiller büyükazı genişliğinin stabil kaldığı bildirilmiştir (79). Mew (80), genişletme miktarına göre 1,5-4 yıl arasında pekiştirme uygulanması gerektiğini belirtmiştir. 2 aylık retansiyon dönemi sonunda maksiller kaidede elde edilen genişletmenin 3,75 mm'den 3 mm'ye, nazal kavitede 2,5 mm'den 2 mm'ye düştüğü; dentisyondaki değişimin daha az olduğu ve inter-kanin genişlik artışının 8 mm'den 7,5 mm'ye düştüğü bildirilmiştir (81). Thorne, nazal genişlikte ortalama 1,7 mm artış saptamış; 2 aydan az retansiyonda kalanlarda relaps gözlenirken, 2 aylık retansiyon sonucu vakaların stabil kaldıklarını belirtmiştir (63).

Stabilizasyon bitiminde dokulardaki rezidüel kuvvetler, alveolar prosesler üzerinde rebound oluşturmaktadırlar (37). Bu yüzden daralmış dental arkların aşırı düzeltimi bukkal segmentlerin dikleşmesini kompanse edecektir (41, 75). Maksiller genişletmede kolapsa neden olan kuvvetlerin yaklaşık 6 hafta devam ettiği belirtilmiştir (68). Halazonetis ve ark. (77), hızlı üst çene genişletmesi öncesi ve sonrası bukkal kasların üst 1. büyükazı bölgesinde uyguladığı basıncın değişip değişmediğini incelemişler ve 3-4 aylık pekiştirme periyodu sonrası dahi nüks olabileceğini

bildirmişlerdir. Küçükkeleş ve Ceylanoğlu (78), hızlı üst çene genişletmesi sonrası retansiyon döneminde dudak, yanak ve dil basınçlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, hızlı üst çene genişletmesi sonrası bukkal tarafta üst 1. büyükazı ve kesici dişler bölgesinde basınçta belirgin bir artış görüldüğünü, retansiyon döneminde basıncın azalmaya başladığını tespit etmişlerdir. Retansiyonun 3. ayında ise genişletme öncesi değerlere benzer sonuçlar bulmuşlardır. Genişletme ile birlikte üst 1. büyükazı ve kesicilerin palatinal tarafında dil basıncı azalırken, genişletme sonrası normal değerlere dönüş saptanmıştır. Sonuçlara göre, retansiyonun 3. ayında yanak ve dudakların dental arkın yeni pozisyonuna adaptasyonu daha kolay olurken, dilin adaptasyonu daha uzun sürmektedir.

Krebs (82), sabit retansiyon sırasında, dental ark genişliği korunsa da infrazigomatik bölgede bulunan implantlar arası mesafenin 3 aylık retansiyon periyodu boyunca ortalama %10-15 arası azaldığını belirtmiştir. Hareketli apareylerle yapılan retansiyon sırasında da relapsın devam ettiğini, ortalama 15 ay sonra, infrazigomatik maksiller genişlik artışının yaklaşık %70'inin korunduğunu bildirmiştir.

Yetersiz retansiyon periyodu, iskeletsel relapsla sonuçlanacağından hızlı genişletilmiş maksiller suturların yeniden organizasyonu ve stabilizasyonu için 3-6 aylık retansiyon periyodları önerilmektedir (41, 63, 65, 71, 83). Bazı araştırmacılar da daha uzun pekiştirme süreleri önermektedirler (75, 84). Ankraj dişlerin kök yüzeylerinde görülen iatrojenik rezorbsiyon prosesi genişletme sonrası 9 aya kadar devam etmekte ve rezidüel yüklerin uzun dönem etkinliklerini göstermektedir (85).

Chang, McNamara ve Herberger (86), hızlı üst çene genişletmesinin uzun dönem yan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 25 hasta üzerinde uyguladıkları hızlı üst çene genişletmesi tedavisinden 6 yıl sonra oluşan değişiklikleri incelemişler ve Haas tipi aparey ile yüksek mandibular düzlem açısına sahip hastalarda bile bu uzun süre sonunda kapanışın açılmadığını ortaya koymuşlardır. Uzun dönemde Haas tip genişleticinin yüzün vertikal ve ön-arka yön boyutlarını etkilemediği bildirilmiştir. Sarnas ve ark. (87), hızlı üst çene genişletmesi tedavisinin etkilerini 12 yaşındaki bir

çocuğun maksillasına yerleştirdikleri üç implantı, röntgen stereometri yöntemi kullanarak, 10 yıl boyunca incelemişler ve hızlı üst çene genişletmesi sonrası maksiller rotasyon kadar maksiller translasyon hareketinde de aşırı nüks olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde RME'nin açık kapanış, mandibulanın posterior rotasyonu gibi istenmeyen etkilerinin uzun dönemde geri dönüşümlü olduğu; bu nedenle hızlı üst çene genişletmesi sonrası büyüme gelişim veya ortodontik tedavinin etkileriyle, hızlı üst çene genişletmesinden kaynaklanan tüm vertikal değişikliklerin kompanse olacağı belirtilmiştir (88).

Linder-Aronson ve Lindgren (24), hızlı üst çene genişletmesinin iskeletsel ve dişsel etkilerini 13 olguda pekiştirme sonrası 5 yıllık süreçte incelemişler ve hızlı üst çene genişletmesinin *overbite*'ı azalttığı, *overjet*'i arttırdığı yönündeki genel görüşün aksine hızlı üst çene genişletmesinin istenmeyen yan etkilerinin bulunmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, 5 yıllık periyod sonunda ANB açısında çok küçük bir artışın olduğunu saptamışlardır.

Wertz (41), yaptığı nüks çalışması ile genişletme için optimal yaşın 13-15 yaşları öncesi olduğunu, daha geç yaşlarda da genişletme sağlanabileceğini ancak sonuçların tahmin edilebilir ve stabil olmayacağını bildirmiştir. Haas (75), süt ve karışık dişlenme dönemlerinde yapılan genişletmenin daha stabil olacağını belirtmiştir.

Benzer şekilde Bishara (13), RME için optimal yaşın 13-15 yaş olduğunu daha yetişkin hastalarda genişletme mümkün olsa bile sonuçların tahmin edilemeyeceğini ve uzun dönemde relapsların görülebileceğini belirtmektedir.

Tüm bu bulguların sonucunda araştırmacılar tarafından genişletme sonrası aparey ağızdan çıkarılmadan önce üç aylık retansiyon dönemi tavsiye edilmektedir. Üç aylık pekiştirme sonrası sökülen apareyi takiben kalın ve geniş ark teli ile retansiyona devam edilir. Sutural genişleme bölgesinde yeni kemik oluşumu beklenmeden sadece dişlerden destek alan retansiyon apareyleri uygulanırsa sutural bölgenin geri kapanması engellenemez (62).

2.2. Deneysel Ortodontik Kuvvet ve Deneysel Hayvanı Olarak Sıçan Kullanılması

Tıp biliminin gelişiminden bu yana, insan yapısının anlaşılabilmesi için, başta anatomi ve fizyoloji çalışmaları olmak üzere, tıbbın birçok alanında hayvanlar model olarak kullanılmıştır (89).

Ortodonti alanında yapılan hayvan çalışmalarında, sıçan, köpek, kedi ve maymun gibi birçok hayvan türü kullanılmış, yapılan çalışmalarla ortodontik kuvvete verilen biyolojik yanıt daha iyi anlaşılmasına çalışılmıştır (90). Bu çalışmalar ile ilgili önemli kaygılardan biri, elde edilen bulguların insanlara uyarlanıp uyarlanamayacağı olmuştur (91). Yapılan deneysel çalışmalarda 1 sıçan yaşam günününün 30 insan gününe denk geldiği belirtilmiştir (92).

Yapılan çalışmaların çoğunda deney hayvanı olarak sıçan kullanılmaktadır. Bu nedenle sıçanların ve insanların alveol kemikleri ve periodontal ligamentleri (PDL) arasındaki morfolojik ve fizyolojik farklılıklar dikkate alınmalıdır.

Sıçanların alveol kemikleri daha yoğun olup osteon içermez. Osteoid doku miktarı ise insanlara oranla daha azdır (93). Yapılan histolojik çalışmalarda, destek dokularında ve periodontal fibrillerin düzeninde de farklılıklar olduğu görülmüştür (94), (95). Sıçanların normal PDL genişliği yaklaşık olarak 0,12-0,15 mm'dir (96).

Sıçanların azı dişleri ise insanlarınkine oranla, yaklaşık 50 kat küçüktür. Bu fark, uygulanacak ortodontik kuvvetin büyüklüğünün belirlenmesinde oldukça önemlidir (91).

Sıçanlarda kök gelişimi sırasındaki doku gelişimi ve ortodontik uygulamalar sırasındaki doku yanıtı daha hızlı gerçekleşmekle birlikte, temel mekanizmaları insanınkine benzerlik göstermektedir (97, 98).

2.3. Kemik Dokusu

Kemik, kollojen yapı içerisinde yer alan kalsiyum ve fosfat kristallerinden oluşan damarlanma ve sinirce zengin özel bir bağ dokusudur. Kemik dokusunun temel görevleri; şekil ve rijidite sağlamak, diğer dokulara ve hayati organlara destek olmak, bu organları korumak ve vücuda hareket yeteneği sağlamaktır (99).

2.3.1. Kemik Hücreleri

Kemik hücreleri, kemik dokunun kendi içerisinde ya da kemik iliğinin mezenkimal kök hücreden (MSC) zengin stromasında bulunmaktadır (100). Friedenstein (101), farklı genlerin, aktivasyon zincirini başlatan farklı moleküler sinyallere cevaben, kök hücreden kaynak alarak oluşan, 5 hücre tipi bildirmiştir. Bunlar; fibroblast, osteoblast, kondroblast, adiposit ve myoblasttır. Belirttiğimiz beş hücre tipinden osteoblastları daha detaylı inceleyecek olursak;

Osteoblast

Yaklaşık 20-30 µm büyüklüğünde, çok yüzlü formdaki osteoblastlar (100), kemik iliğinin mezenkimal kök hücrelerinden, endostiyum, periost ve perivasküler perisitlerden kaynak alır (102). Osteoblastların matrikse doğru uzanan sitoplazmik uzantıları, osteosit ağıyla ve komşu osteoblastlarla iletişim kurmalarını sağlar (100).

Osteoblastik aktivite, bu hücrelerin yüzeylerinde reseptörleri bulunan çeşitli büyüme faktörleri tarafından otokrin ve parakrin olarak düzenlenir. Osteoblastların yüzeylerinde ayrıca paratiroid hormonu, tiroid hormonu (103), büyüme hormonu (104), insülin (105), progesteron (106) ve prolaktin (107) reseptörleri de bulunmaktadır.

Osteoblastlar organik matriks sentezler ve açığa çıkardıkları alkalik fosfataz enzimi (ALP), mineralizasyonun gerçekleşmesine izin verir (100).

İnsanda 1 ila 10 haftalık ömre sahip olan osteoblastlar, apoptoz yoluyla yok olarak, kemik yüzeyini örten hücrelere veya osteositlere dönüşebilmektedir (108). Osteoblastlardan endosteal yüzeyde bulunanlar, kemiğin yeniden şekillenmesinde aktivasyonunda önemli rol oynar. (100).

Osteosit

Osteoblastlar kendi sentezledikleri matriksin kalsifiye olmasıyla osteositlere dönüşür (99). Osteoblastlara oranla daha az aktivite gösteren bu hücreler, kemik yapının korunmasında temel rol oynar (109, 110).

Erişkin iskeletinin kemik hücrelerinin % 90-95'inden fazlasını oluşturan osteositler, canlılıklarını yıllar boyunca korur (111). Genç osteositler osteoblastların birçok özelliğine sahip olmakla birlikte, bu hücrelerin hacimleri ve protein sentezleme kapasiteleri daha azdır. Kalsifiye dokunun derinlerinde yer alan daha yaşlı osteositlerin hacimleri ise çok daha küçüktür ve sitoplazmalarında glikojen birikmiştir (112).

Her biri matriks ile çevrili olan osteositler, kendi aralarında ve diğer kemik hücreleriyle kemik yıkımının uyarılmasında rol oynadığı düşünülen (113), (110) dentritik uzantılarının oluşturduğu ağ yoluyla iletişim kurar (112).

Osteositlerin, kemik yapısının ve kütesinin korunmasından sorumlu, mekanik uyarılara hassas hücreler olduğu konusunda da bir fikir birliği oluşmuştur (114, 115). Bu hücrelerin kemik dokudaki gerilime cevap verdikleri ve osteoklastları ihtiyaç alanlarına çekerek yeniden şekillenme olayının hızını arttırdıkları düşünülmektedir (116).

Osteoklast

Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden kaynak alan osteoklastlar (104), kemik yıkımından sorumlu kemik hücreleridir (100).

Yaklaşık 100 µm büyüklüğünde, çok çekirdekli hücreler olan osteoklastlar (100), erişkin iskeletindeki tüm kemik hücrelerinin %1'den az bir kısmını meydana getirir. Her bir mm³ kemikte yaklaşık 2-3 tane osteoklast bulunmaktadır. Osteoklastların sayıları aktif kemik yenilenmesinin arttığı bölgelerde artar (117). Bu hücrelerin yaşam süreleri günlerle ifade edilecek kadar kısadır (111).

Osteoklast hücreleri hareketli, çok çekirdekli, lizozomal enzimler içeren hücrelerdir (118). Bu hücreler ayrıca mitokondri ve serbest ribozomdan zengindir ve yaygın bir golgi kompleksi içerir (119).

Bu hücrelerin membranları önemli iki özelliğe sahiptir: Rezorpsiyonun gerçekleştiği tırtıklı kenar ve matrikse bağlanmayı sağlayan integrinlerin bulunduğu mikrofilamentten zengin düz alan (100). Tırtıklı yüzeyler, hidroklorik asit ve proteolitik enzimin salgılanacağı hücre zarının yüzey alanını arttırmaktadır (120). Osteoklastlar, rezorbe edilecek alana hareket ederek, tırtıklı kenarlarıyla mineralize doku yüzeyine tutunur ve bu alanın kenarlarını integrinler ile örter (100). Tırtıklı kenarların bağlandığı yüzeylerde, osteoklastların enzimatik etkinliği ile çukurcuklar oluşur (117).

Osteoklastik aktivite lokal olarak etki gösteren sitokinler ve sistemik hormonlar tarafından kontrol edilmektedir (112). Kalsitonin (121), androjen (122), tiroid hormonu (123), insülin (124) ve interlökin (IL)-1 (125) için osteoklastik reseptörler tanımlanmıştır.

2.3.2 Kemik Gelişimi

İntramembranöz (Zarsal) Kemikleşme

Kafatasındaki frontal, parietal, oksipital ve temporal kemikler ve klavikula intramembranöz kemikleşme göstermektedir. Fibröz bağ dokusunda mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşır kemikleşme merkezi oluşturmaktadırlar. Kemikleşme merkezindeki osteoblastlar kemik matriks (osteoid) salgılamaktadır. Salgılanan osteoid, birkaç gün içerisinde mineralize olmaya başlar. Mineralize olan osteoid içerisinde kalan osteoblastlar osteositlere dönüşmektedir. Kan damarlarının etrafını saran osteoid, süngerimsi kemiğin oluşmasını sağlamaktadır. Damarlardan zengin mezenkimal doku, süngerimsi kemiğin dış yüzeyinde periostun oluşmasında etkilidir (126).

Endokondral (Kıkırdaksal) Kemikleşme

Endokondral kemikleşmede hiyalin kıkırdak kemik yapımı için iskelet görevi görmektedir. Hiyalin kıkırdağın kemik dokuya dönüşebilmesi için öncelikle kıkırdağın yıkımının gerçekleşmesi gerekmektedir. Kemikleşme birincil kemikleşme merkezinde başlamaktadır. Hiyalin kıkırdağı saran perikondriuma damarların infiltre olması sonucunda perikondriumun altındaki mezenkimal hücrelere gelen besin miktarı artmaktadır ve mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşmaktadır. Hiyalin kıkırdağın yıkımı sonucunda oluşan kavitede kemikleşme meydana gelmektedir. Kıkırdağın içindeki kavitelerde kemikleşmenin gerçekleşmesi sonrasında epifizlerde ikincil kemikleşme merkezleri oluşmaktadır. Birincil ve ikincil kemikleşme alanları arasında epifizyal kıkırdak plağı kalmaktadır. Diafiz uzarken ve medullar kavite de oluşmaktadır. Kıkırdak büyüdükçe kemik kalsifiye olmaktadır ve medullar kaviteye bakan epifizyal yüzeylerde kemik spikülaları oluşmaktadır. İkincil kemikleşmenin başlamasından sonra epifiz kemikleşmektedir. Sonuçta hiyalin kıkırdak sadece epifizyal yüzeylerde (artiküler kıkırdak) ve diafiz-epifiz birleşimindeki epifizyal plaklarda kalmaktadır (126).

2.3.3. Kemik Remodelingi

Dinamik bir doku olan kemikte, sürekli olarak belirli bir denge içerisinde rezorpsiyon ve formasyon olayları gerçekleşir (127). Eski kemiğin devamlı olarak yeni kemikle yer değiştirdiği remodeling işlemi, ilk kez 1990 senesinde Frost (128) tarafından tanımlanmıştır.

Kemik remodelingi, iskeletsel dokunun tamir ve yenilenme ihtiyacına cevap veren, hayat boyu devam eden döngüsel bir süreçtir (129). Mikroskopik düzeyde kemik remodelingi, kortikal ve trabeküler kemik yüzeylerinde “Kemik Çok Hücreli Birimi” (*Basic Multicellular Units*) adı verilen küçük alanlarda gerçekleşir (127).

Kemik remodelingi, mekanik kuvvetler karşısında kemiğin şeklini değiştirmek yoluyla devamlılığın sağlanması ve eski organik kemik matriksinin yenilenerek dayanıklılığının devamlı kılınması sebebiyle fizyolojik önem taşımaktadır (130).

Rezorpsiyon süreci, osteoblastların yüzeyindeki Nüclear Faktör Kappa-B Ligant Reseptör Aktivatörü (RANKL) sitokininin, osteoklastlar üzerindeki Nüclear Faktör κ B Reseptör Aktivatörü (RANK) reseptörüne bağlanması ile osteoblastların olgunlaşması sayesinde aktive olur (131, 132). Osteoklast hücreleri yaklaşık 10-14 günlük bir süreç (99) boyunca, kemiği rezorbe ederek 0,2-1 mm çapında ve birkaç milimetre uzunluğunda tüneller açar. Daha sonra, osteoklastların ortadan kalkmasıyla, tünelleri dolduran osteoblastlar yeni kemik oluşturmaya başlar. Böylece, ancak 6-9 aylık (99) uzun bir sürede tamamlanacak olan formasyon süreci başlar.

Remodeling rezorpsiyon dönemi ile başlar. Bu dönemde ilk olarak kısmen farklılaşmış tek çekirdekli preosteoklastlar, çok çekirdekli osteoklastlara dönüşmek üzere kemik yüzeyine göç ederler. Rezorpsiyonun tamamlanmasını takiben kemik yüzeyinde tek çekirdekli hücreler görünür. Bu hücreler osteoblastların göç etmesi ve farklılaşmaları için sinyal oluştururken, kemik yüzeyini osteoblastlar tarafından gerçekleştirilecek olan yeni kemik yapımına hazırlarlar. Rezorbe olan alanlar tamamen

yeni kemik ile doldurulduktan sonra kemik yüzeyi *lining* hücreleri ile kaplanır. Yeni bir remodeling işlemi başlayana kadar dinlenme dönemi söz konusudur (112).

Rezorpsiyon daima formasyondan önce gerçekleştiği ve genç bireylerde rezorbe olan kemik miktarı ile yeni oluşan kemik miktarı benzer olduğu için remodeling normal şartlar altında, bir denge içerisinde gerçekleşir (133). Rezorpsiyon ve formasyon arasındaki bu denge, birbiriyle de ilişkili olan genetik, mekanik, vasküler, hormonal, lokal ve beslenmeyle ilgili faktörlere bağlıdır (127).

2.3.4. Kemik Dokusunun Özellikleri

Histolojik açıdan incelendiğinde, kemiğin, yüksek seviyede bir damarlanma ve innervasyona sahip, mineralize bir bağ dokusu olduğu görülmektedir (100). Kemik dokunun temel fonksiyonları, form ve rijidite sağlamak, diğer dokulara destek olmak, bu dokuları korumak ve hareket yeteneği sağlamaktır (99). Kemik dokusu, mineral metabolizmasında da kalsiyum ve fosfat deposu olarak görev yaparak önemli bir rol oynar (112, 134).

Kemik kütlelerinin yaklaşık % 65'ini mineral içerik oluşturur. Bu içeriği oluşturan kalsiyum, fosfat ve karbonat küçük hidroksiapatit kristallerini meydana getirir. $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ şeklinde formüllendirilen bu kristal yapılar, yaklaşık 400 Å uzunluğunda, 10-30 Å kalınlığında ve 100 Å genişliğinde uzun yassı plaklar şeklindedir. Kemiğin mineral kısmında, daha az oranda olmakla birlikte, magnezyum, sodyum, potasyum, manganez ve florür de bulunmaktadır.

Kemik kütlelerinin yaklaşık üçte birini organik matriks oluşturur (100). Bu oran yeni oluşan kemikte daha yüksek olabilmektedir (130). Organik matriks temel olarak proteinlerden oluşmaktadır (100). Kalsiyum ve fosfor için potansiyel bir rezervuar olmasının dışında ekstraselüler matriks, yapısındaki proteinler sayesinde hücreler farklılaşmada ve kemik dokunun bütünlüğünün ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (135). Kemik dokusunun içerdiği protein yapının % 90'ı kollajenlerden

oluşmaktadır. Bu yapının % 95'inden fazlası Tip I kollajen, % 5'ten azı ise Tip V kollajendir. Bunların dışında kemiğin organik matriksinde, Sharpey lifleri ile ilişkili olarak az miktarda Tip III kollajen ve mekanik stres altında oluşan Tip XII kollajen de saptanmıştır (100).

Organik matriksin diğer kısmını ise kollajen olmayan proteinler oluşturmaktadır. Bunlar; proteoglikanlar, karboksiglutamik asit içeren proteinler, glikoproteinler, plazmadan kaynaklanan proteinler ve büyüme faktörleridir (100).

Olgun kemiğin histolojik olarak iki tipi vardır: kortikal (kompakt) ve trabeküler (süngerimsi) kemik. Kortikal kemik, vücuttaki toplam kemiğin % 75'ini, trabeküler kemik ise % 25'ini oluşturmaktadır (99).

Kortikal ve trabeküler kemiğin anatomik dağılımını, gerilme ve sıkışma dirençleri belirler. Sıkışmaya direnç gösteren trabeküler kemik, bu özelliği nedeniyle vertebrada çoğunlukta olan kemik tipidir (99).

Kemiğin gerilme ve sıkışma direncini belirleyen faktörlerden biri, kortikal ve trabeküler kemiğin dağılımıdır (99). Kemik dokusunun kollajen fibriler içeriği ve minerallerden oluşan kristal yapısı da gerilme ve sıkışma direncinin oluşmasında etkilidir. Kemik, sıkışmaya karşı oldukça güçlü bir yanıt verirken, gerilmeye de buna yakın bir direnç gösterir (130). Mekanik gerilim, osteoblastik aktiviteyi ve VEGF gibi pro-anjiyogenik faktörleri uyarır; dolayısıyla kemik oluşumunda önemli role sahiptir (136).

Kemik Dokusu Yapım-Yıkım Döngüsü

Sert ve mineralize bir yapı olarak tanımlanan kemik doku, % 2,5 oranında esneyebilir, bu sırada oluşan sıkışma ve gerilme bölgeleri, formasyon ve rezorpsiyon oluşmasına neden olur (134).

Yoğun ve düzenli bir yapı gösteren kortikal kemik, uzun kemiklerin gövdesinde ve düz kemiklerin yüzeyinde bulunur. Kortikal kemik, “Havers sistemi” olarak adlandırılan merkezi kanalların etrafında, içiçe geçmiş kemik matriks lamellerinden oluşur. Bu lameller üzerinde, “laküna” adı verilen küçük boşluklar vardır. Bu boşlukların içerisinde “osteosit” adlı kemik hücreleri bulunur (99). Kortikal kemiğin beslenmesi lenf ve kan damarları, sinir ve bağ dokusu içeren Havers kanalları yoluyla gerçekleşmektedir (137). Trabeküler kemiğe oranla daha yavaş bir yapım-yıkım döngüsü (*turnover*) hızına sahip olan kortikal kemik, temel olarak destek ve koruma görevi yaparken, ciddi ve uzun süreli mineral yetersizliklerinde de metabolik cevaba fayda sağlar (112).

Trabeküler kemik yumuşak, düzensiz ve daha elastik bir yapı göstermektedir. Uzun kemiklerin uç kısımlarında, düz kemiklerin iç kısımlarında ve vertebrada bulunan bu kemik tipi, birbiriyle bağlantıları olan trabeküllerden oluşur. Stres çizgileri boyunca uzanan trabeküllerin devamlılığı, kemiğin gücünü yüksek oranda artırır (99). Trabeküler kemikte beslenme, kortikal kemikten farklı olarak, ekstraselüler sıvıdan difüzyon yoluyla gerçekleşir. Metabolik olarak daha aktif olan trabeküler kemiğin yıllık yenilenme hızı % 20, kortikal kemiğin yıllık yenilenme hızı % 4’tür (137). Akut mineral yetersizliklerinde ihtiyacın karşılanmasında ilk görevi trabeküler kemik yapar (112).

2.3.5. Hızlı Üst Çene Genişletmesi ile Oluşan Histolojik Değişimler

Suturlar dinamik yapıya sahip olup mekanik uyarılara da yanıt verirler. Suturlara uygulanan kuvvetler her zaman anabolik hücresel aktiviteye neden olmamaktadır; kuvvetin şiddetine ve polaritesine bağlı olarak katabolik hücresel aktivite de gözlemlenebilmektedir. Gerilim kuvvetleri genellikle sutural kemik gelişimini artırırken, baskı kuvvetleri hücre ölümlerine ve sutural rezorpsiyona neden olabilmektedir (138).

Suturlara uygulanan mekanik stres, sutural bağ dokusunda bulunan hücrelerin plazma membranında fiziksel değişikliklere neden olmaktadır ve bağ dokusu

hücrelerinin hücre membranı geçirgenliklerinde artış görülmektedir. Hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) seviyeleri artmaktadır ve hücrel aktivite başlamaktadır (139).

Resus maymunlarında midpalatal suturu inceleyen Cleall ve ark. (140), kuvvet uygulanması ile suturun açıldığını ve oluşan boşluğun disorganize fibröz bağ dokusu ile dolduğunu; fakat daha sonra hızlı bir şekilde kemikleşerek suturun normal görünümünü kazandığını bildirmişlerdir.

Gardner ve Kronman, maymunları, maksiller genişletme sonrası ultraviyole ışık altında incelemişler ve midpalatal suturla birlikte maksillanın infratemporal bölgesinde, sfenoidin büyük kanatlarında, zigomatik arkta, pterygoid plaklarda ve hamular proseslerde kemik apozisyonu tespit etmişlerdir (58).

Hızlı genişletilmiş bir sutural dokunun histolojik resminde serbestçe yüzen kemik parçaları, çok sayıda mikro-kırıklar, kist şeklinde oluşumları, enflamasyon yapısında ve yüksek derecede damarlanmış disorganize bağ dokusu ve olgunlaşmamış kemik dokusuyla birlikte hızlı distrofik ossifikasyon gözlenmektedir. Her ne kadar sutural bağ dokusu elemanları suturun rejenerasyonunu sağlayacak şekilde proliferasyona uğrasalar da, genişletilmiş yapıları tekrar daraltıcı rezidüel kuvvetler tam olarak dağılmadan stabil bir maksiller kompleks elde edilememektedir. Midpalatal suturdaki sert dokuların yeniden organizasyonu aktif genişletmenin hemen sonrasında başlamaktadır (17, 65, 71, 140, 141).

Starnbach ve Cleall (141), 1964'te hızlı genişletme sonrası periodontal dokularda oluşan değişiklikleri maymunlar üzerinde histolojik olarak incelemişler ve periodontal liflerde düzensizlikle beraber basınç tarafındaki alveolar kemikte rezorbsiyon tespit etmişlerdir. En fazla hücrel aktiviteye de nazal suturda rastlamışlardır.

Genç yaşlarda artmış iskeletsel cevabın büyümekte olan suturda hücrel aktivitenin çok fazla olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (54).

Kanekawa ve Shimizu (55), maksiller parçaların birbirinden ayrılmasıyla yeni kemik oluşumunun başladığını; ancak kemik oluşum hızının yaşla birlikte azaldığını bildirmişlerdir. Pubertal büyüme atılımı sonrasında da genişletme yapılabileceğini; ancak genişletmenin kolay olmayacağını, kalıcılığının garanti edilemeyeceğini ve yeni kemik rejenerasyonu için uzun süre beklemek gerektiğini ortaya koymuşlardır.

2.4. Kemik Yapım-Yıkımını Etkileyen Faktörler

Kemik yapım-yıkımında rol alan büyüme faktörleri; Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (TGF- α), Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), Fibroblast Büyüme Faktörü-1 (FGF-1), Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2), Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β), Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF) ve Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) ve bu faktörlerin kaynakları ve etki alanları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir (142- 149)

Tablo 2.1: Büyüme Faktörleri

Büyüme Faktörü	Kaynak	Etki
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	<ul style="list-style-type: none">• Aktif Makrofajlar• Tükürük Bezleri• Keratinositler	<ul style="list-style-type: none">• Granülasyon Dokusu Oluşumu• Keratinosit Migrasyonu• Keratinosit ve Fibroblast Mitojen
Dönüştürücü Büyüme Faktörü- α (TGF- α)	<ul style="list-style-type: none">• Aktif Makrofajlar• Keratinositler• T-Lenfositler	<ul style="list-style-type: none">• Kemotaktik Sitokin Ekspresyonu• Antimikrobiyal Peptid Ekspresyonu• Hepatosit ve Epitelyal Hücre Proliferasyonu
Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	<ul style="list-style-type: none">• Mezenkimal Hücreler• Osteoblastlar	<ul style="list-style-type: none">• Damarsal Geçirgenlik• Endotelyal Hücre Proliferasyonu
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	<ul style="list-style-type: none">• Trombositler• Makrofajlar• Endotelyal Hücreler• Düz Kas Hücreleri• Keratinositler	<ul style="list-style-type: none">• Yara Remodelingi• Anjiyogenez• Fibroblast, Endotelyal Hücre, Düz Kas Hücreleri Proliferasyonu• Granülosit, Makrofaj ve Fibroblast Aktivasyonu• Granülosit, Makrofaj, Fibroblast, Düz Kas Hücreleri Kemotaksisi
Fibroblast Büyüme Faktörü1 (FGF-1) Fibroblast Büyüme Faktörü2 (FGF-2)	<ul style="list-style-type: none">• Makrofajlar• Mast Hücreleri• T-Lenfositler• Endotelyal Hücreler• Fibroblastlar	<ul style="list-style-type: none">• Yara Kontraksiyonu• Anjiyogenez• Keratinosit Migrasyonu• Fibroblast ve Keratinosit Proliferasyonu• Fibroblast Kemotaksisi
Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β)	<ul style="list-style-type: none">• Trombositler• T-Lenfositler• Makrofajlar• Endotelyal Hücreler• Keratinositler• Düz Kas Hücreleri• Fibroblastlar	<ul style="list-style-type: none">• Anjiyogenez• Fibroplazi• Keratinosit Proliferasyonu• Matriks Metalloproteinaz Üretimi İnhibisyonu• Granülosit, Makrofaj, Fibroblast, Düz Kas Hücreleri ve Lenfosit Kemotaksisi
Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF)	<ul style="list-style-type: none">• Keratinositler	<ul style="list-style-type: none">• Keratinosit Proliferasyonu, Migrasyonu ve Farklılaşması
Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	<ul style="list-style-type: none">• Mezenkimal Hücreler	<ul style="list-style-type: none">• Epitelyal ve Endotelyal Hücre Proliferasyonu• Hepatosit Motilitesi

2.4.1. Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü, günümüze kadar keşfedilmiş en önemli anjiyogenik büyüme faktörüdür. VEGF'in keşfiyle beraber anjiyogenik araştırmalar hız kazanmıştır. VEGF, inflamatuvar, endotelyal, nöronal hücreler üzerinde çeşitli etkiler oluşturabildiği gibi retinopatilerden kansere kadar çeşitli hastalıkların patogenezinde de etkisi vardır. VEGF'nin normal ve patolojik anjiyogeneze etkileri olduğu düşünülmektedir. VEGF, damarsal gelişim ve morfogenez, damarsal tonus ve geçirgenliği, inflamatuvar ve endotelyal hücrelerin kemotaksisi üzerinde etkilidir. VEGF fonksiyonu miktarı, etki ettiği hücrelere ve hücre dışı mikro-çevre koşullarına bağlı olarak dokunun ihtiyacına göre değişmektedir (150).

VEGF'nin yukarıda bahsedilen etkileri sebebi ile günümüzde tıp alanında ilaçların içeriğinde yer almaktadır (Tablo 2.2) (151).

Tablo 2.2: VEGF'nin Tıp Alanında Kullanımı

Hastalık	Kullanılan İlaç	Muhtemel Klinik Faydası
Sedef Hastalığı	VEGFA İnhibitörleri	Anjiyogenezi ve İnflamasyonu Azaltır
Oküler Hastalıklar	VEGF <i>Trap</i>	Anjiyogenezi Baskılar
Romatoid Artrit	VEGF İnhibitörleri	Fibröz Dokularda Anjiyogenezi Azaltır
Tümör Anjiyogenezi	VEGF İnhibitörleri VEGF-A Çözülebilir VEGF Reseptörleri (VEGF <i>Trap</i>)	Tümör Anjiyogenezi Engeller Lenfanjiyogenez
Ven Grefti	VEGF-D	Ven Grefti Uygulama Başarısını Arttırır
Lenfödem	VEGF-C ve VEGF-D	Lenfanjiyogenez
Kemik İyileşmesi	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, PIGF	Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez
Yara İyileşmesi	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, PIGF	Anjiyogenez ve Lenfanjiyogenez
Koroner Arter Hastalıkları	VEGF-A, VEGF-D ve PIGF	Anjiyogenez
Periferel Atardamar Hastalıkları	VEGF-A, VEGF-D ve PIGF	Anjiyogenez

VEGF ve benzeri anjiyogenik büyüme faktörleri dokuya uygulanan biyomateryallerin kanlanmasını arttırmaktadırlar (152); ancak VEGF'nin anjiyogenik aktivitesi doza bağlı olarak değişmektedir (153, 154). VEGF'nin dozuna bağlı olarak damarlanma düzeni değişmektedir. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki VEGF 120'nin iki katına çıkartılması, hiper-vaskülerizasyona, dilate, düzensiz (155- 157) ve işlevsiz damarlanmaya neden olmaktadır (152).

VEGF, sistein büyüme faktörü ailesinin glikoprotein yapılı bir üyesidir ve çeşitli hücreler tarafından salgılanır. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-1 ve PlGF-2, VEGF'in bilinen izoformlarıdır. VEGF-A'nın 121, 145, 165, 183, 189, 206 amino asitli 6 farklı izoformu vardır (158). VEGF izoformlarının fonksiyonları Tablo 2.3.'de gösterilmiştir (159).

Tablo 2.3: Büyüme Faktörlerinin Fonksiyonları

VEGF İzofomları	Fonksiyon
VEGF-A	<ul style="list-style-type: none"> • Anjiyogenez • Endotelial hücrelerin migrasyonunu artırır • Endotelial hücrelerin çoğalmasını artırır • Metan mono-oksijenaz aktivitesini artırır • $\alpha_v\beta_3$ aktivitesini artırır • Damar çeperi oluşumu • Fenestrasyon oluşturma • Granülositler ve makrofajlar için kemotaktik • Vazodilasyon (dolaylı yoldan)
VEGF-B	<ul style="list-style-type: none"> • Embriyonik miyokardiyal anjiyogenez
VEGF-C	<ul style="list-style-type: none"> • Lenfanjiyogenez
VEGF-D	<ul style="list-style-type: none"> • Bronşiolollerin etrafındaki lenfatik damarlanma gelişimi
PlGF	<ul style="list-style-type: none"> • Vaskülarizasyon • İnflamasyon, kanser, iskemi ve yara iyileşmesinde anjiyogenez

Hipoksi durumunda VEGF-A'nın *hypoxia-inducible factor-1 α* (HTF-1 α) aracılığı ile mRNA ekspresyonu artmaktadır. HTF-1 α hipoksik durumun bir medyatörüdür. Aynı zamanda büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler ve hormonlar da VEGF-A'nın mRNA ekspresyonunu uyarmaktadır (159).

PlGF, ilk olarak plasentada keşfedilmiş bir VEGF ailesi üyesidir; ancak kalpte ve akciğerlerde de bulunduğu bilinmektedir. PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 ve PlGF-4 PlGF'nin 4 izoformudur. PlGF-1 ve PlGF-3 heparin ile bağlanamaz iken PlGF-2 ve PlGF-4 heparin ile bağlanabilmektedir. PlGF, hem kendi başına hem de diğer VEGF'ler ile birlikte anjiyogenezi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda peri-vasküler dokularda PlGF-2'nin fazla üretilmesinin VEGF-A165 ve VEGF-A121 miktarını arttırmakta olduğu ve anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir. PlGF'nin monositler üzerinde güçlü kemotaktik etkisi bulunmaktadır ve dokularda makrofajların birikmesine neden olmaktadır; dokuda artan makrofaj miktarı ile birlikte üretilen VEGF-A miktarı da artmaktadır (159).

Hipoksi, VEGF-A'da olduğu gibi VEGF-B'nin artışına neden olmamaktadır. VEGF-B167 ve VEGF-B186, VEGF-B'nin insanda eksprese edilen 2 izoformudur. VEGF-B167, iskelet kaslarında, miyokartta ve kahverengi yağ dokusunda bulunmaktadır. VEGF-B, VEGFR-1 ve Nrp-1 reseptörlerine bağlanabilmektedir; fakat VEGF-A ile birlikte aynı reseptöre bağlanarak heterodimer de oluşturabilmektedir. VEGF-B'nin vücuttaki görevi tam olarak bilinmemektedir; ancak inflamatuvar anjiyogeneizde zayıf etkisi olduğu düşünülmektedir (159).

VEGF-C erişkinlerde kalpte, plazentada, yumurtalıklarda ve tiroid bezinde üretilmektedir. VEGF-C, temel lenf-anjiyogeniz büyüme faktörüdür ve lenf-anjiyogenetik etkisini VEGFR-3 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. Ancak VEGF-C, kan damarlarının geçirgenliğini artırma görevini VEGFR-2 reseptörü aracılığıyla yapmaktadır (Tablo 2.3.) (159).

VEGF-D salgılanan bir glikoproteindir ve yapısal olarak %48 oranında VEGF-C'ye benzemektedir. VEGF-D, damar endotelinde, kalpte, iskelet kaslarında, akciğerlerde ve bağırsakta üretilmektedir. İnsan VEGF-D'si VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerine bağlanırken fare VEGF-D'si sadece VEGFR-3'e bağlanmaktadır. VEGF-D'nin anjiyogenik görevleri vardır; aynı zamanda patolojik durumlara tepki olarak

lenfatik damarların büyümesine, tümör anjiyogenezine ve lenf-anjiyogenezinde görevli olduğu düşünülmektedir (159).

VEGF-E ilk olarak *parapoxvirus*'ün (Orf Virüsü) genomunda keşfedilmiştir. VEGF-E, VEGFR-2 ve Nrp-1 reseptörlerine özel bağlanmaktadır. VEGF-E, epitelyal mitogenezde ve damarsal geçirgenlik artışında görevlidir. VEGF-E gen ekspresyonu, güçlü anjiyogenik etki oluşturmaktadır (159).

VEGF-F, yılan zehirinde keşfedilmiştir. VEGF-F, VEGF-A165'in etkisini bloke etmektedir (159).

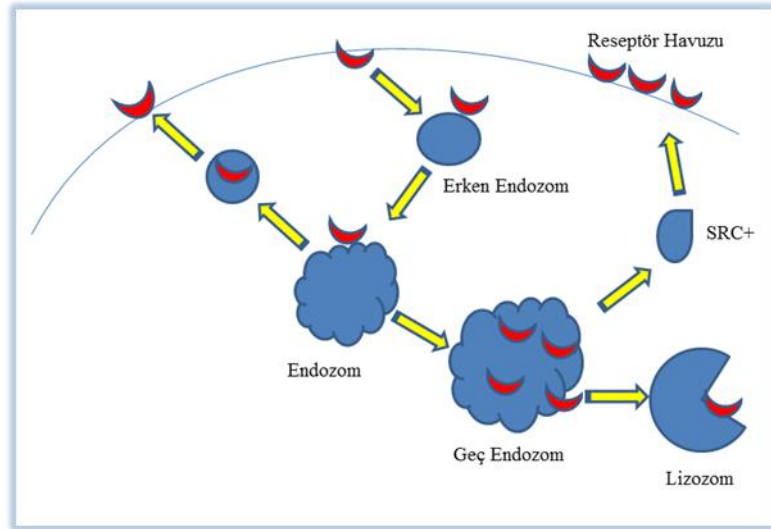
VEGF'nin vazodilatatif etkisi vazo-aktif protein histaminden 50.000 kat fazladır; dolayısıyla VEGF'e ilk başlarda "*vascular permeability factor*" (PDF) denmiştir. VEGF ve reseptörleri embriyonegez döneminde damarların etrafında üretilmektedir. Postnatal dönemde VEGF mRNA'sı düzeyi azalmaktadır. VEGF üretiminin postnatal olarak durması durumunda ise yeni damarlanmanın engellenmesi sebebi ile kemik gelişimi engellenir. İnsanlarda VEGF geni, altıncı kromozomun kısa kolu üzerinde yer alır ve 7 intron tarafından birbirinden ayrılan 8 eksondan oluşur. Aynı gen farklı VEGF izoformlarını oluşturabilmektedir (150).

VEGF'nin Biyokimyasal Özellikleri

VEGF'nin hücre membranındaki reseptörü ile bağlanması, VEGF reseptörünün dimerleşmesine ve fosforilizasyonuna neden olmaktadır. Fosforilizasyon, VEGF ile aktive olan reseptörün hücre içerisine alınmasında önemlidir (160). Reseptör-VEGF etkileşimi ve VEGF reseptörünün hücre içi döngüsü Resim 2.1.'de gösterilmektedir.

Reseptör inhibitörü SU5416, reseptörün hücre içine endositoz yolu ile alınmasını engelleyebilmektedir. VEGF uyararı ile aktive olan reseptörün endositozu *clathrin*'e bağlıdır ve reseptörün hücre içine alınması birçok şekilde gerçekleşebilmektedir ve

buna “*clathrin*’e bağlı endositoz” denilmektedir. VEGF aktivasyonu sonucunda geç endozomlarda reseptör miktarı artmaktadır. VEGF aktivasyonu sonucunda hücre içinde reseptör geri-dönüşümü hızlanmaktadır; ancak VEGF uyarısı miktarı endositoz oranını arttırmamaktadır Uyarılmamış VEGF reseptörleri de, endotelial hücre membranından hücre içine sabit bir hızla girmektedir ($\sim 0,14 \text{ dk}^{-1}$) ve hücre membranındaki reseptörlerin yarısı 10 dakika içerisinde hücre içerisine girebilmektedir. Reseptörlerin bu kadar hızlı hücre içerisine alınabilmesi, hızlı bir geri-dönüşüm sistemi ile dengelenmektedir. Lizozom içerisinde ayrıştırılması ile sadece %30-40 oranında reseptör kaybı gerçekleşmektedir ve reseptörlerin lizozomlar içerisindeki yarılanma ömrü 30 dk olarak bildirilmiştir. Reseptörün VEGF ile ilişkisinden yaklaşık 30 dk sonra reseptör/Src vezikülleri oluşmaktadır ve geri, hücre membranına hareket etmektedirler; dolayısıyla veziküllerin hücre membranına dönmesi ile hücre membranında pro-anjiyonik uyarılara aşırı hassas reseptör/Src bölgeleri görülmektedir. *VE-cadherin* endotelial hücre membranında VEGF reseptörü ile bağlanmaktadır ve reseptörün hücre içine alınmasını engellemektedir. VEGF ile uyarılmamış endotelial hücre yüzeyinde iki farklı reseptör havuzu oluşmaktadır: *VE-cadherin* ile bağlanmış sabit reseptör havuzu ve sabit hızla geri-dönüşüm döngüsü içerisinde olan reseptör havuzu. Sabit hızla geri-dönüşüm döngüsü içerisindeki VEGF reseptörlerinin hareketleri VEGF’ten bağımsızdır (160).



Resim 2.1: Reseptör-VEGF etkileşimi ve VEGF reseptörünün hücre içi döngüsü

Hücre yüzeyinde sıklıkla vasküler epitelyal büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2) görülmektedir ve VEGFR-2, VEGF-A ile homodimer oluşturmaktadır. VEGF-A, vasküler epitelyal büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1) ile de heterodimer oluşturabilmektedir; ancak VEGFR-1'in VEGFR-2'ye göre daha düşük sinyal gücü vardır. VEGFR-1'in de VEGF'e olan afinitesi daha yüksektir. VEGFR-1'in VEGFR-2 yerine VEGF ile bağlanması anjiyogenik aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Golgi cisimciğinde yüksek miktarda VEGFR-1 olduğu gösterilmiştir. Hücrenin VEGF ile uyarılması sonucunda ilk önce hücre membranındaki VEGFR-2, VEGF ile birleşmektedir ve hücre içerisine girmektedir. Daha sonra golgi cisimciğindeki VEGFR-1 reseptörleri hücre membranına giderek ortamdaki VEGF ile bağlanmaktadır ve geri hücre içine girmektedirler; ancak bu döngünün gerçekleşebilmesi için Ca^{++} gerekmektedir (160).

VEGF'nin cilt altına enjeksiyonu, mikro vasküler hiper permeabiliteye; dolayısıyla damardan plazma fibrinojeninin çıkmasına bağlı pıhtı ve ödem oluşmasına neden olmaktadır (161).

VEGF ailesi büyüme faktörlerinin oluşturduğu biyolojik yanıt, her bir büyüme faktörünün minör yapısal farklılıkları ve reseptör bağlanma karakteristiği ile ilgilidir. VEGF ailesi büyüme faktörleri 3 tirozin-kinaz reseptörünün aktivasyonu yolu ile işlev gösterirler. Tirozin-kinaz reseptörleri (RTK), genellikle endotelyal hücreler tarafından üretilirler (162). Tirozin-kinaz reseptörleri:

- i. Flt-1 (VEGFR-1)
- ii. Flk-1 (VEGFR-2 veya KDR)
- iii. Flt-4 (VEGFR-3)

VEGFR-1'in biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır; ancak anjiyogenezin negatif düzenleyicisi olduğu ve monosit kemotaksisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (159).

VEGF-A, VEGFR-1'i ve VEGFR-2'yi aktive eder. VEGF-B ve PlGF, sadece VEGFR-1'i aktive ederler. VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-2'yi ve VEGFR-3'ü aktive ederler (162). VEGFR-1 ve VEGFR-2, vasküler endotel hücreler tarafından üretilirler (163).

Erişkinlerde KDR (*kinase insert domain receptor*) ve VEGFR-3 kan ve lenf damarları üzerinde bulunan en önemli VEGF reseptörüdür (159) ve endotel hücre migrasyonunda, anjiyogenezde ve damar geçirgenliğinin artırılmasında görev alır. VEGFR-3, lenfatik damarlanmada; dolayısıyla tümör hücrelerinin metastazında etkilidir (162).

Flt-1 (Fms benzeri tirozin kinaz, VEGFR-1), keşfedilen ilk VEGF reseptörüdür. VEGFR-1, PlGF ve VEGF-B'nin reseptörüdür ve vasküler endotel hücrelerde ve bazı vasküler olmayan hücrelerde (hematopoetik kök hücreler, makrofajlar ve monositler) üretilir (164- 166). VEGFR-1 ve VEGFR-2 embriyonik gelişimde görev alırlar (162). Embriyonik dönemde üretiminin aksaması durumunda kan damarlarının organize olamamasına sebep olur ve damar fonksiyon yetersizliğine bağlı uterus bebek ölümü gerçekleşir (164- 166). VEGFR-1, makrofaj ve monosit migrasyonunda, artık VEGF-A'nın sekestrasyonunda (162) ve vazodilasyonda görev alır (159).

VEGFR-1 tirozin kinaz varlığında PlGF, makrofajlara ve monositlere etki ederek inflamatuvar sitokinlerin ve kimokinlerin (tümör nekroz faktör- α , interlökin1- β , monosit kemotaktik protein-1) üretimini sağlar (167); bu sebeple VEGFR-1'in inflamasyonda önemli rol aldığı düşünülmektedir (150).

Nörofilin-1 (Np-1) ve Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) izoformlara özel reseptörlerdir. Np-1, 165 amino-asidi bulunan VEGF-165'e özel reseptördür (168). Np-1'in fazla salınımı dilate kapiller ve kan damarlarının oluşmasına; az salınımı ise yetersiz damarlanmaya ve embriyo ölümlerine neden olmaktadır (169, 170). Hücrelerde Np-1'in VEGF-165'e bağlanması sonucu belirgin bir değişiklik görülmemektedir (171, 173); ancak ortamda VEGFR-2'nin varlığında Np-1'in biyoaktivitesi ve VEGFR-2,

VEGF-165 arasındaki bağlanma artmaktadır (168, 174). VEGF-165 üzerinde Np-1 ve VEGFR-2 için bağlantı yerleri belirlidir; dolayısıyla VEGF-165'in her iki reseptöre de aynı anda bağlanarak etki gösterdiği düşünülmektedir (175, 176). VEGF izoformlarının bağlandıkları reseptörler ve dokularda oluşturdukları etkiler Tablo 2.4.'te gösterilmiştir (159, 177).

Tablo 2.4: VEGF ve Reseptörlerinin Kaynağı ve Etkileri

VEGF Reseptörü	Kaynağı	Etki Yeri	Etkisi
VEGFR-1 (Flt-1)	<ul style="list-style-type: none"> Vasküler Endotelial Hücreler Hematopoetik Kök Hücreler Monositler ve Makrofajlar Osteoklastlar 	VEGFA	<ul style="list-style-type: none"> Makrofaj ve monosit migrasyonu
		VEGFB	<ul style="list-style-type: none"> Artık VEGF-A'nın sekestrasyonu
			<ul style="list-style-type: none"> Sitokinlerin ve kimokinlerin üretimi
			<ul style="list-style-type: none"> İnflamasyon
		PIGF	<ul style="list-style-type: none"> Plazental Damarsal Gelişim
VEGFR-2 (Flk-1, KDR)	<ul style="list-style-type: none"> Osteoklastlar 	VEGFA	<ul style="list-style-type: none"> Endotelial hücre migrasyonu
		VEGFC	<ul style="list-style-type: none"> Anjiyogenez
		VEGFD	<ul style="list-style-type: none"> Damar geçirgenliğinin artırılması
VEGFR-3 (Flt-4)	<ul style="list-style-type: none"> Tükürük Bezi Tümörü Hücreleri Miyoeptelial Hücreler 	VEGFC	<ul style="list-style-type: none"> Lenfatik damarlanma
		VEGFD	<ul style="list-style-type: none"> Tümör hücrelerinin metastazı
Nörofilin-1 (Np-1)	<ul style="list-style-type: none"> Osteoklastlar Osteoblastlar Hipertrofik Kondrositler 	VEGFA	<ul style="list-style-type: none"> Kapiller ve damarların dilatasyonu
			<ul style="list-style-type: none"> Kemik rejenerasyonu

Morfogenlerin iki ailesi olan anjiyopoetinler (Ang) ve VEGF-A, kan damarı gelişiminde direk etkilidirler. VEGF ve reseptörü nötrofilin1, kemik rejenerasyonunda görev alırlar. VEGF-A ve reseptörü nötrofilin1'den başka VEGF-B, C ve D ve ilgili reseptörleri de maksiller genişletme bölgesinde bulunurlar; ancak düşük miktardadırlar (178). Ang1, yeni damarların oluşumunu sağlayan VEGF ailesinden farklı olarak damar

bütünlüğünü korur. Ang2 ise Ang1'in antagonistidir ve VEGF ile birlikte üçü damar remodelingi ve oluşumunda görev alırlar (178).

2.4.2 Kemik Metabolizmasında VEGF'nin Yeri

İskelet dokusunun bileşenlerinin progenitörleri olan kemik iliği kök hücreleri, damarlar vasıtasıyla taşınırlar; dolayısıyla osteogenezin oluşabilmesi için vaskülarizasyona ihtiyaç vardır (8). Damarlanmanın yetersiz gelişmesi oksijen, besin ve büyüme faktörlerinin ilgili alana gerektiği kadar ulaştırılmamasına ve kemik oluşumunda yetersizliğe neden olmaktadır. Osteoblastlar hipoksi durumuna yanıt olarak VEGF üretirler. VEGF 164 ve VEGF 188'in eksikliğinde damarlanma yetersiz gelişmektedir (179, 180). VEGF, osteoklastların oluşumunda, migrasyonunda, rezorptif etkilerinde ve yaşayabilmelerinde etkilidir (181- 183). Osteoklastlar da Flt-1, Flk-1 ve Np-1 gibi VEGF reseptörlerini üretirler (182, 184).

İnflamasyon ve hipoksi neoplastik olmayan anjiyogenezin temel uyarıcılarıdır (149). Hipoksi, kırık iyileşmesinde anjiyogenetik döngünün güçlü bir uyarıcıdır (178). Yapılan çalışmalarda hipoksinin, Hipoksiye Bağlı Transkripsiyon Faktörlerini (HIFs) (*hypoxia-inducible transcription factors*) uyardığı ve HIF'lerin de VEGF, nitrik oksit sentetaz (NOS) (*nitric oxide synthase*), PDGF, Ang2 gibi anjiyogenik faktörlerin sentezlenmesini sağladığı belirtilmiştir. Hipoksi, anjiyogenez dışında damarsal yapıyı yıkım döngüsünde etkilidir (149). Aynı zamanda epifizyal kırıkda belirli bir büyüme gösterdiklerinde hipoksi gerçekleşmekte ve hipoksi, olgunlaşmamış kondrositlerde VEGF ekspresyonunu tetiklemektedir. Çözünebilen VEGF izoformları perikondriyuma diffüze olmakta ve epifizyal damar ağı oluşturarak sekonder kemikleşmeyi uyarmaktadırlar (185).

Kemik kırıkları, lokal damarlarda yırtılmaya, kırık alanında kanamaya ve hematoma oluşumuna neden olmaktadır. Böylelikle *non-spesifik* kemik iyileşmesi süreci başlamaktadır. Kırık bölgesine sırasıyla inflamatuvar hücreler ve MSCs gibi progenitör hücreler gelmektedir. Bu hücrelerden sitokinler, anjiyogenez regülatörleri ve

VEGF, FGF, PDGF ve TGF- β benzeri büyüme faktörleri salınmaktadır (186). VEGF, kırık bölgesine primer insan osteoblastlarının kemotaksisini sağlar ve hücre proliferasyonunu %70'e kadar arttırmaktadır (9). VEGF, osteoblastik hücrelerin diferansiyasyonunu ve migrasyonunu etkiler (10). *In-vitro* ortamda VEGF, osteoklastların formasyon, hayatta kalma ve yıkıcı aktivitelerini arttırabilmektedir; aynı zamanda gelişmekte olan uzun kemiklerde osteoklastlar için bir kemoatraktan olarak görev yapabilmektedir (181- 183).

Ayrıca distraksiyon osteogenezinde (D.O.) en fazla intramembranöz kemikleşme, aktif genişletme döneminde görülür. D.O.'da kemik kırık iyileşmesinden farklı olarak intramembranöz kemikleşme gerçekleşir. Kemik dokusundaki optimal anjiyogenik yanıt distraksiyon miktarı ile ilişkilidir. D.O.'da çevre dokularda kan akımı artar, dokularda anjiyogenik yanıt oluşur ve kapiller damar prekürsör hücreleri, fibröz kemik boşluğuna gelir (178). Mekanik stabilite, kemik iyileşmesinin erken inflamatuvar fazında önemlidir. Kırık parçaların orta derecede hareketi, vasküler yanıtı tetikler ve gelişmiş kemik rejenerasyonu sağlar. Aşırı kompresyon, makaslama ve torsiyon kuvvetleri kan damarlarını sıkıştırır ve iyileşmeyi sürecini bozar (186).

Bir VEGF 164 reseptörü olan Np-1 (168) osteoblastlarda (184) ve hipertrofik kondrositlerde üretilir (187). Kemik gelişiminde VEGF 164 ve VEGF 188 izoformlarının eksikliği, hipertrofik kondrositlerin, osteoblastların, endotelial hücrelerin ve osteoklastların normal diferansiyasyonlarını ve düzenli aktivitelerini engellemektedir. Hipertrofik kondrositler VEGF eksprese ederler (10). VEGF 164 ve VEGF 188'in inaktif olması durumunda uzun kemiklerde anjiyogenez yetersiz gerçekleşir; dolayısıyla trabeküler kemik hacmi azalır ve büyüme plağında hipertrofik kondrosit alanı görülür, büyüme plağı morfogenezi bozulur. VEGF izoformları endokondral kemikleşmede de önemli rol alır (10).

2.5. Altın Nano Parçacıklar

Günümüzde birçok nanoteknoloji ürünü nano malzeme vardır. Ancak belirli boyut ve şekillerdeki formlarının toksik olmayan soy metal olması (188), asidik ortamlardan etkilenmemeleri (189), oksidasyona uğramamaları (190), yüzey kimyalarının kolaylıkla değiştirilebilmeleri ve kolayca sentezlenebilmeleri (191), ilaçların taşınmasında, kontrollü salınımlarında, etkinliklerini ve spesifitelerini arttırmada kullanılabilmesi (188) sebebi ile altın nano-parçacıklar (AuNP) diğer nanoparçacıklardan farklıdır. AuNP'lerin kanser hücrelerini öldürme yöntemlerinden biri olan fototermal terapide (192, 193), gen aktarımında ve hücresel araştırmalar için nano-probe hazırlanması gibi uygulamalarda kullanımının güvenli olduğu düşünülmektedir. Biyo-medikal uygulamalarda çubuk ve küre şekilli AuNP'ler sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bütün bu sebeplerden ötürü tıpta kullanımları yaygın olarak araştırılmaktadır (191).

Antikorlar, ilaçlar, ligantlar, DNA, organik boyalar, proteinler, peptitler, anti-kanser ajanlar, terapötik etkili biyomoleküller AuNP'lere kimyasal olarak bağlanabilmektedirler (194). AuNP'lerin yüzey özellikleri değiştirilerek VEGF gibi biyo-moleküllerin *in-vivo* farmako-kinetikleri ve dolaşımında kalma süreleri geliştirilebilir (195).

2.5.1. Altın Nano Parçacıkların Tarihçesi

Altın tuzlarının tıpta kullanımı eski çağlara dayanır ve krizo-terapi olarak adlandırılır. Eski Mısır'da, Çin'de ve Hindistan'da altın, cilt ülserlerinin, frenginin, kızamığın ve çiçek hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (196). Ayrıca AuNP'ler eski çağlarda camın renklendirilmesinde kullanılmıştır. AuNP'lerin, içinde bulunduğu süspansiyona rengini veren yapılar olduğu, 1850 yılında Michael Faraday tarafından farkedilene kadar bilimsel olarak ele alınmamıştır. AuNP'lerin süspansiyonunda, AuNP'lerin vişne renginde ışık saçılımlarına neden olduğu farkedilmiştir. 20. Yüzyılın başında AuNP'lerin bulunduğu koloidal süspansiyonun rengi Gustav Mie, Maxwell'in

elektromanyetik teorisi kullanılarak yüzey plazmonlarıyla ilişkilendirilmiştir. AuNP'lerin plazmonik özelliği, görünür bölge ışığının etkileşmesiyle nanoparçacık yüzeyinde oluşan manyetik alanı ve absorbe edilmeyip saçılan ışığı ifade eder ve bu özelliğin keşfedilmesiyle birlikte birçok alanda kullanımları araştırılmaya başlanmıştır (191).

2.5.2. Altın Nano Parçacıkların Sentezlenmesi

Altın iyonlarının indirgenmesinin gerçekleştirildiği çeşitli AuNP sentez yöntemleri vardır. Kullanılan indirgeme ajanına göre sentezlenen AuNP'lerin şekilleri, boyutları ve yüzey özellikleri değişmektedir. Sodyum sitratın sudaki çözeltisi kullanılarak 10-150 nm boyut aralığında uniform altın nano parçacıklar elde edilebilmektedir (197- 199). Uygulamalarda AuNP'ları optimize etmek için sentez sonrası yüzey modifikasyonları yapılmaktadır (191).

Turkevich metodu kullanılarak birkaç nm'den birkaç 100 nm boyutunda AuNP'lar altın/sitrat oranı değiştirilerek elde edilebilir (200). Büyük parçacıklar elde etmek daha az sodyum sitrat kullanmak gerekmektedir. 1,5-5 nm boyutunda AuNP'lar elde edebilmek için ise Faraday'ın çift faz sistemi kullanılmaktadır (201, 202).

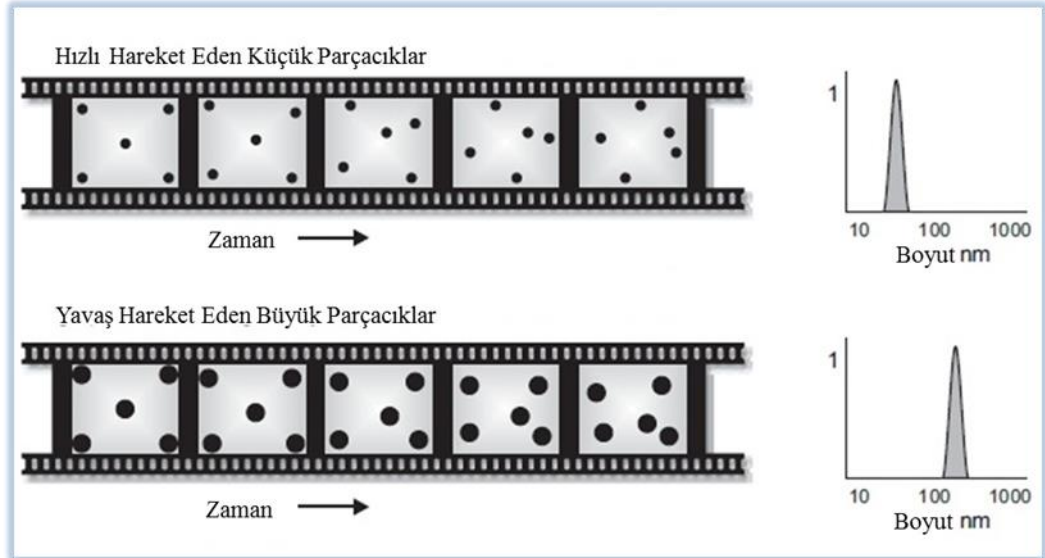
2.5.3. Altın Nano Parçacıkların Spektroskopisi

AuNP'ların yüzey plazmon rezonansına bağlı, görünür ışıkta ve infrared ışığı bandına yakın bölgede geniş optik soğurma/saçılma gösterdiği bilinmektedir (203). AuNP'lar ve hücre organelleri farklı ışık spektrumlarında farklı renkler vermekteler. Tek başına 50 nm boyutundaki AuNP sarı renkte görünürken dielektrik küre mavi görülmektedir (203). AuNP'ların boyutları küçüldükçe yaptıkları saçılım miktarı da azalmaktadır. 30 nm boyutundan küçük AuNP'ların saçılımları mikron boyutundaki veziküllerin saçılımlarından düşük kalmaktadır; dolayısıyla AuNP'ların hücre içinde tespitleri güçleşmektedir (203).

Zetasizer Nano Cihazı

Zetasizer (veya Dynamic Light Scattering, DLS) cihazı, sıvı ortam içerisindeki parçacığın parçacık boyutunu, Zeta potansiyelini ve moleküler ağırlığını ölçmede kullanılan cihazdır. Zetasizer Nano ZS cihazı 632,8nm dalga boyunda, He-Ne, 4,0mW, kırmızı lazer ışığı kullanarak ölçümlerini yapmaktadır (204).

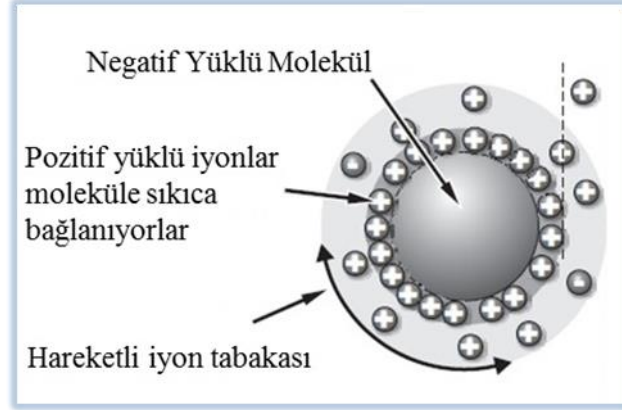
Süspansiyon içerisindeki parçacıklar “Brownian Hareketi” yasasında açıklandığı gibi, boyutlarına bağlı olarak farklı hızlarda hareket ederler; küçük parçacıklar hızlı hareket ederken, büyük parçacıklar yavaş hareket ederler. Aynı parçacığın iki farklı fotoğrafı çekilecek olursa ve ne kadar hızlı hareket ettiği hesaplanırsa parçacığın boyutu ile ilgili fikir edinilebilmektedir. Parçacıkların hareket hızları ile boyutları arasındaki ilişki Resim 2.2.’de gösterilmiştir (204).



Resim 2.2: Parçacıkların hareket hızları ile boyutları arasındaki ilişki (Resim 204 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

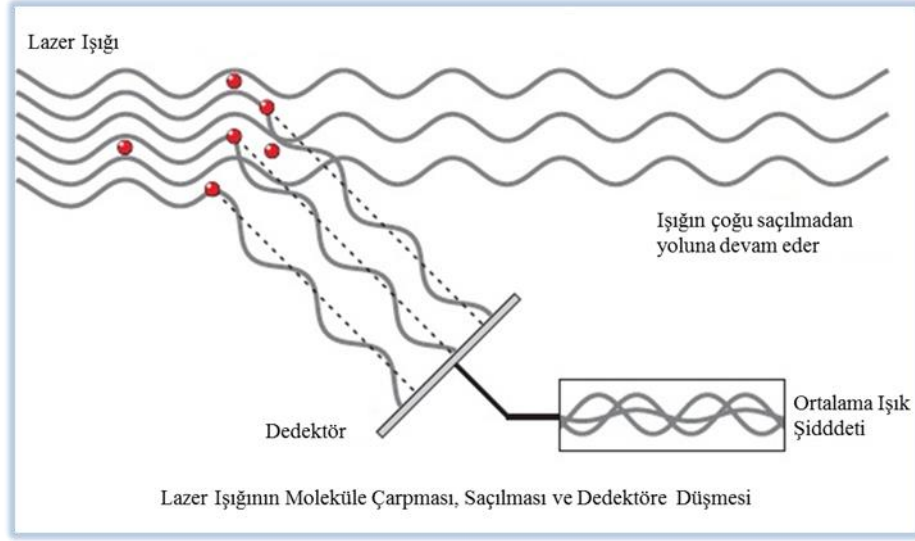
Analiz edilecek negatif yüklü bir molekül veya parçacık, deney tübüne eklendiği zaman süspansiyon içerisindeki pozitif yüklü iyonlar molekülün etrafında birikerek bir tabaka oluşturmakta ve molekül ile birlikte hareket etmeye başlamaktadırlar. Bu sebeple, Zetasizer cihazının yaptığı ölçüm sonucunda bulunan molekül çapına

“Hidrodinamik çap” denilmektedir. Solüsyondaki parçacıkların polariteleri ve hidrodinamik çapları arasındaki ilişki Resim 2.3.’te gösterilmiştir (204).



Resim 2.3: Solüsyondaki parçacıkların polariteleri ve hidrodinamik çapları arasındaki ilişki (Resim 204 no’lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Zetasizer cihazı kullanılarak moleküllerin hidrodinamik çaplarının ölçümü, “Dinamik ışık saçılması” yöntemi; diğer bir adıyla “Foton korelasyon spektroskopisi” kullanılarak hesaplanmaktadır. Moleküllerin boyutu, solüsyon içerisindeki moleküllere gönderilen lazer ışığının molekülden saçılarak yansımalarının şiddeti değerlendirilerek hesaplanmaktadır. Bir molekül ne kadar küçük ise gönderilen lazer ışığı her yöne saçılma göstermektedir; ancak küçük moleküllerin yaptığı lazer ışığı saçılım şiddeti, yüzey alanlarına bağlı olarak büyük moleküllerden daha düşüktür. Moleküllere çarpıp saçılan lazer ışığının şiddeti dedektör tarafından okunmaktadır. Solüsyona gönderilen lazer ışığının parçacıklara çarpıp saçılması ve dedektör tarafından algılanması Resim 2.4.’te gösterilmiştir (204). Dinamik Işık Saçılımı yöntemi ile elde edilen saçılan lazer ışığı şiddetinden moleküllerin çapı ve hacmi ile ilgili bilgiler edinilmektedir (204).



Resim 2.4: Solüsyona gönderilen lazer ışığının parçacıklara çarparak saçılması ve dedektör tarafından algılanması (Resim 204 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Solüsyon içerisindeki moleküllerin boyutları ile “Brownian Hareketi” yasasına göre molekül hızları arasındaki ilişki “Stokes-Einstein Denklemi”nde tarif edilmiştir. Dinamik Işık Saçılması Yönteminde moleküllerin hidrodinamik çaplarının hesabı Stokes-Einstein Denklemi kullanılarak yapılmaktadır. Hidrodinamik çap hesabı ve Stokes-Einstein Denklemi Resim 2.5.’te gösterilmiştir (204).

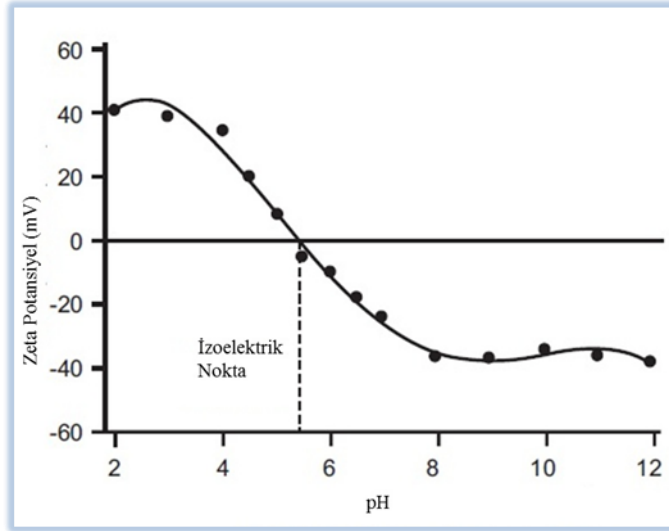
Hidrodinamik Çap Hesabı ve Stokes-Einstein Denklemi:

$$D_H = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

- D_H Hidrodinamik Çap
- k : Boltzmann Sabiti
- f : Parçacık Sürtünme Katsayısı
- η : Solvent Viskositesi
- T : Mutlak Sıcaklık
- D : Difüzyon Katsayısı

Resim 2.5: Hidrodinamik çap hesabı ve Stokes-Einstein Denklemi (Resim 204 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Üzerinde iyonlar bulunan molekülün solüsyon ile arasında elektriksel bir potansiyel oluşmaktadır; bu oluşan potansiyele “Zeta Potansiyeli” denilmektedir. Bir molekülün zeta potansiyelini bilmek bize solüsyon içerisindeki moleküllerin birbirine yapışıp yapışmayacağıyla ve solüsyon içerisinde kararlı kalıp kalmayacağı ile ilgili bilgi vermektedir. Solüsyon içerisindeki moleküllerin aynı elektriksel yük ve yüksek zetapotansiyeli değerlerinin olması moleküllerin birbirlerinden uzaklaşmasına neden olmaktadır. Solüsyon içerisinde +30mV’tan daha pozitif ya da -30mV’tan daha negatif zetapotansiyele sahip moleküller kararlı kabul edilmektedirler. Düşük zetapotansiyele sahip moleküller birbirlerine yapışmaktadırlar. Zetapotansiyeli etkileyen en önemli faktör solüsyonun pH değeridir. Belirli bir pH değerinde solüsyondaki moleküllerin zetapotansiyellerinin sıfır olduğu noktaya “İzoelektrik Nokta” denilmektedir ve bu, moleküllerin en az stabil olduğu durumdur. Zetapotansiyeli ile pH arasındaki ilişki ve İzoelektrik Nokta Resim 2.6.’da gösterilmiştir (204).



Resim 2.6: Zetapotansiyeli ile pH arasındaki ilişki ve İzoelektrik Nokta (Resim 204 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.)

Zetasizer cihazı, molekülün elektroforetik hareketini tespit edip “Henry Denklemi”ni kullanarak molekülün zetapotansiyelinin hesabını yapmaktadır. Moleküllerin elektroforetik hızları, Lazer Dopler Velositemetre kullanılarak ölçülmektedir. Henry Denklemi Resim 2.7.’de gösterilmiştir (204).

Henry Denklemi:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

- z : Zeta Potansiyel
- U_E : Elektroforetik Hareket
- ε : Dielektrik Sabit
- η : Viskosite
- $f(Ka)$: Henry Fonksiyonu

Resim 2.7: Henry Denklemi (Resim 204 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.)

2.5.4. Altın Nano Parçacıkların Hücre İçine Alınması

AuNP'ların medikal uygulamasının yapılabilmesi için hücreye girişinin ve çıkışının iyi anlaşılması gerekmektedir. AuNP'ların her biri hücre yüzeyindeki bir reseptöre bağlanarak endositoz yolu ile hücre içerisine alınmaktadır ve AuNP'ların hücre içerisine endositoz yolu ile alınmalarında AuNP'ların hücre membranındaki konsantrasyonları değil hücre membranındaki reseptörlerin sayısı ve reseptörlerin geri dönüşümleri belirleyici faktörlerdir (205).

Serum proteinlerinin AuNP'ların yüzeyine non-spesifik bağlanması ile AuNP'ların hücre içine alındığı düşünülmektedir (206). İndirgen kimyasallar, hücrelerin AuNP'ları hücre içine almalarını etkilerler; çünkü AuNP'ların yüzey özellikleri hücre içine alınmalarında önemlidir (191). AuNP'ların elektriksel yüklerine bağlı olarak hücre içine alınmalarında farklılıklar görülmektedir (207).

AuNP'ların yüzey özellikleri, elektriksel potansiyelleri, şekilleri, konsantrasyonu, boyutları ve indirgenmesinde kullanılan kimyasal madde, hücre içine alınmalarında etkilidir (191).

Yapılan hücre içine alımın çalışmalarında AuNP'ların hücrede en çok 300-500 nm boyutundaki veziküllerin içine alındığı gösterilmiştir (203). 40 nm çapından küçük AuNP'lar tek başlarına hücre içine alınabilmeleri için gerekli serbest enerjiye sahip değildirler; dolayısıyla bir yumak oluşturup hücre içine girebilmektedirler. Ancak 80 nm çapından daha büyük AuNP'lar ise hücre içerisine nadiren girebilmektedirler (208). Boyutu küçük olan AuNP'ler büyük olanlara göre hücre içine, hücre membranındaki porlar aracılığıyla daha kolay girdikleri düşünülse de yüzey modifikasyonu yapılmamış AuNP'ların endositoz yoluyla hücrelere alındığı öngörülmektedir (207). İlgili alanda bulunan AuNP konsantrasyonu, AuNP'ların hücre içine alınmasında pozitif yönde ilişki gösterir (209). AuNP'ların şekli de hücre içine alınmalarında etkilidir; örneğin çubuk şeklindeki AuNP'ların küresel AuNP'lara göre hücre içine daha zor alındığı bilinmektedir (191). Yapılan transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve floresans mikroskobu çalışmaları endositozun en kolay 40-60 nm boyutundaki AuNP'larda gerçekleşmekte olduğunu göstermiştir (210- 212).

Sağlıklı dokular, sıkı ve sürekli duvarlı damar yapıları ile çevrilidir. Damar duvarlarında 9-50 nm arası porlar mevcuttur. Ancak 9 nm çaplı porlar sayıca, 50 nm çaplı porlara göre 100-1000 kat fazladır (213). Küçük moleküller damarlardan kolaylıkla penetre olabilirken daha büyük yapılar daha yavaş penetre olmaktadır (214).

AuNP'ların üzerlerine bağlanan ligantlar, hücre membranındaki reseptörlerle etkileşime geçerek AuNP'ların sitoplazmaya geçişlerini sağlamaktadırlar. Bu sebeple AuNP'ların üzerinde bağlı bulunan ligant sayısı önemlidir. AuNP'lerin hücre içine girdikten sonra, nükleus (215- 217), mitokondri (218), golgi cisimciği ve endoplazmik retikulum (219) gibi hücre içi yapılarda birikebildiği bilinmektedir.

Oligonükleotid

Oligonükleotidlerin nano partiküller ile konjugasyonunun keşfiyle beraber moleküler düzeyde tanı, materyal sentezi ve gen regülasyonu uygulamalarının

geliştirilmesi hızlanmıştır (211). Oligonükleotid kaplı AuNP'lerin ökaryonik hücre plazma membranındaki porlardan hücre içine girdiği, eksojen DNA'nın hücre kromozomal DNA'sına bağlanabildiği ve eksojen DNA'nın hücre içinde eksprese olabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (220).

AuNP'lar oligonükleotidlerle modifiye edildiklerinde ekstra sellüler proteinlerin DNA-AuNP yapısı ile etkileşime girmesi, DNA-AuNP yapısının hücre içine alınmasını sağlar. AuNP'ların hücre içine alınması ile DNA-AuNP konjugasyonu arasında doğrusal bir ilişki vardır (211). Hidrofilik yüzey özellikleri, AuNP'ların dolaşım sisteminde daha uzun süre kalmalarını sağlar (221).

2.5.5. Altın Nano Parçacıkların Biyo-güvenilirliği

Metalik altının biyogüvenilirliği, 1950'li yıllardan beri yapılan *in-vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır (222). Ancak özel amaçlara yönelik hazırlanmış AuNP'ler belirgin sito-toksisite gösterebilmektedir (221). Bu sorunlara açıklık getirebilmek amacı ile AuNP'lerin insan hücreleri üzerinde sitotoksiteleri detaylı araştırılmıştır ve 250 µm'ye kadar boyutu olan parçacıkların toksik olmadığı, ancak iyonik altının 25 µm boyutunda sitotoksik olduğu bulunmuştur (223). Yapılan *in-vitro* çalışmalar dışında hayvan modellerinde AuNP'ler kullanılarak yapılmış az sayıda toksikolojik çalışma vardır. *In-vitro* çalışmalar dokuların fizyolojik yanıtı hakkında *in-vivo* çalışmalar kadar anlamlı sonuçlar veremediği için hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır (222). AuNP'lerin yüzey kaplamalarına, boyutlarına, dozuna, uygulama yoluna ve çalışma süresine göre yapılmış toksisite çalışmalarının özeti Tablo 2.5.'te gösterilmiştir. Zhang ve ark. (222), yaptıkları *in-vivo* çalışmada 13,5 nm boyutundaki küresel AuNP'lerin farelere oral, intra peritoneal ve kuyruk veni yolu ile uygulanması sonucunda kontrol grubu ile kıyaslandığında farelerin ağırlıklarında değişiklik bulmamışlardır ve makroskopik organ, vasküler ve davranışsal değişiklikler bildirmemişlerdir. Kuyruk veni yoluyla AuNP enjeksiyonunun, sırasıyla intra peritoneal ve oral AuNP uygulamalarından daha az toksik olduğunu bulmuşlardır. Farelere uygulanan 550-1100 µg/kg AuNP ise kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden kaynağını alan kırmızı

kan hücrelerinin sayısında anlamlı derecede azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Lasagna-Reeves C. ve ark. (224), farelerde yaptıkları çalışmada, farelere 320-3200 µg/kg/gün AuNP enjeksiyonunun neden olduğu toksisitenin düşük olduğu bulmuşlardır.

Tablo 2.5: Altın Nano Parçacıkların *In-vivo* Toksikitesi Özet Tablosu

Çalışma Grubu	AuNP Yüzey Kaplaması	AuNP Boyutu (nm)	Çalışma Süresi	AuNP Dozu	AuNP Uygulama Yolu	Muhtemel Toksikite
Hillyer	yok	4,10,28	7 gün	20000 µg/kg	Oral	Kuvvetli Gastrointestinal emilim
		ve 58				
Hainfeld	PBS ile tamponlanmış	01.Eyl	5 dk.	1350 µg/kg	Kuyruk Veni	Dalاک
de Jong	yok	10,50,100	24 saat	77-120 µg/kg	Kuyruk Veni	Dalاک
		ve 250				
Sonavane	yok	15,50,100	24 saat	1000 µg/kg	Kuyruk Veni	Dalاک
		ve 200				
Kim	PBS ile tamponlanmış	20 ve 100	24 saat	1000 µg/kg	Kuyruk Veni	Dalاک
Chen	yok	3,5,8,12,17,	21 gün	8000 µg/kg/hafta	Intraperitoneal	Dalاک
		37 ve 50				
Cho	HS-PEG	4, 13 ve 100	4-30 dk.,	170-4200 µg/kg	Kuyruk Veni	Karaciğerde akut inflamasyon ve apoptozis. Uzun dönemde organ hasarı
			1-7 gün			
Semmler-Behnke	yok	1.4 ve 18	24 saat	54-530 µg/kg	Intratrakeal ve Intravenöz	Dalاک
Balasubramanian	yok	20	1 gün, 1 hafta,	10 µg/kg	Intravenöz	Dalاک ve Karaciğer
			1 ve 2 ay			
Zhang	PEG-TA veya HS-PEG	20, 40	48 saat	100-4400 µg/kg	Kuyruk Veni	Yok ama AuNP boyutu arttıkça AuNP'nin stabilitesi azalıyor
		ve 80				
Lipka	PEG	5	1-24 saat	570-870 µg/kg	Kuyruk Veni ve Intratrakeal	Dalاک
Lasagna-Reeves	yok	12.May	8 gün	40-400 µg/kg/gün	Intraperitoneal	Düşük Toksikite
Sadauskas	yok	40	1 gün, 1,	1400-1600 µg/kg	Kuyruk Veni	Dalاک
			3 ve 6 ay			
Fent	Arap sakızı ve maltoz	6-10 ve 15-20	1-24 saat ve 7-32 gün	2000 µg/kg	Intravenöz	Dalاک
Zhang	yok	13.May	14, 28 gün	137.5-2200 µg/kg	Kuyruk Veni	Düşük Toksikite
					İntraperitoneal	Orta Toksikite
					Oral	Orta Toksikite

PEG: Poli-etilen-glikol, PBS: Fosfat ile Tamponlanmış Serum

AuNP sentezinde kullanılan indirgen kimyasallara, AuNP'ların boyutuna (206), (225), şekline (226), nano parçacığın konsantrasyonuna ve kaplandığı maddeye (227) göre AuNP'ların hücrelere özel toksisite yaratabilme özelliği mevcuttur (199). Yapılan çalışmalarda katyonik AuNP'ların anyonik AuNP'lara göre daha toksik olduğu (221) ve AuNP'ların polietilen glikol ile kaplanmasının toksisiteyi azalttığı bulunmuştur (227). Nano çubukların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar AuNP'ların sitotoksitesine neden olabilmektedir (191).

Biyo-moleküllerin hücre içine alınmasında poli-katyonik lipozoma benzeyen maddeler kullanılır. AuNP'ların yüzey özellikleri, peptidler ve oligonükleotidler (polianyonik tek sarmallı DNA) gibi biyolojik moleküller kullanılarak modifiye edilmektedir (211). Yapılan çalışmalarda 5-15 nm boyutundaki AuNP'ların 50-100 nm boyutundaki AuNP'lara göre organlara dağılımlarının daha fazla olduğu ve özellikle karaciğer ve dalakta biriktikleri bulunmuştur (228). 13,5 nm boyutunda AuNP'ların biyo-uyumluluklarının iyi olduğu bilinmektedir (222).

Yapılan *in-vitro* çalışmalarda AuNP'nin hücreler üzerinde hayati etkilerinin olmadığı bilirse de yapılan son çalışmalar, AuNP'ların hücreler ile teması sonucunda otuzdan fazla genin aktive olduğunu göstermiştir (229). Kon-fokal mikroskop ile hücre içerisindeki AuNP çökeltileri incelendiğinde, AuNP'ların mitokondrilerin yakınında konumlandıkları görülmektedir. AuNP'ların hücre içerisinde çökeltme miktarı hücre içi iyonik özelliklere göre değişim göstermektedir, dolayısıyla kanser hücresinde ve sağlıklı hücrede AuNP çökeltme miktarları farklılık göstermektedir (191).

2.6. Stereolojik İnceleme Yöntemi

Stereoloji, bir nesnenin 2 boyutlu mikroskobik görüntüleri üzerinde yapılan ölçümlerle, nesnenin 3 boyutlu bilgilerine ulaşılması yöntemidir. Stereolojik yöntem kullanılarak tekrarlanabilir, az miktarda değişkenlik gösteren ve gerçeğe yakın sonuçlar elde edilebilmektedir. Stereolojide, ilgilenilen geometrik yapıdan istenilen doğru

sonuçlar elde edebilmek için geometrik yapının uzaydaki boyutuna uygun “*probe*” (sonda) seçilmelidir (230).

Görüntülerde ortaya çıkan kesit yüzey alanlarının, hacimlerinin hesaplanmasında preparat tablası kontrollü hareket edebilen özel olarak dizayn edilmiş mikroskoplar, bu mikroskobun bağlandığı bir bilgisaya ve stereolojiye özel yazılımları olan görüntü analiz sistemleri kullanılabilir.

2.7. Cavalieri İlkesi ile Hacim Hesaplanması

Düzensiz bir ekle sahip nesnelerin hacmini hesaplamaya yarayacak bir yöntem İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından geliştirilmiştir. Cavalieri düzenli bir geometrik ekle sahip olmayan üç boyutlu hacimlerini birbirine paralel dilimlere ayırarak hesaplanabileceğini ortaya koymuştur.

Cavalieri yöntemi ile önce hacmi hesaplanacak yapı dilimlere ayrılır, her dilimin kesit yüzey alanı bulunup kesit kalınlığı ile çarpılarak ilgili dilimin hacmi hesaplanır ve nihayet dilimlerin hacimleri toplanarak ilgilenilen yapının toplam hacmi elde edilir (231).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma, Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (13 Ocak 2012, Karar No: 235). Çalışmamızda Kobay A.Ş.'den (Ankara) temin edilen, ağırlığı 200-250 g. arasında olan 30 adet 14 haftalık Wistar sıçanı kullanılmıştır. Deney hayvanları, her kafeste üç veya dört adet sıçan bulunacak şekilde önceden numaralandırılmış kafeslere yerleştirilmiştir (Resim 3.1).

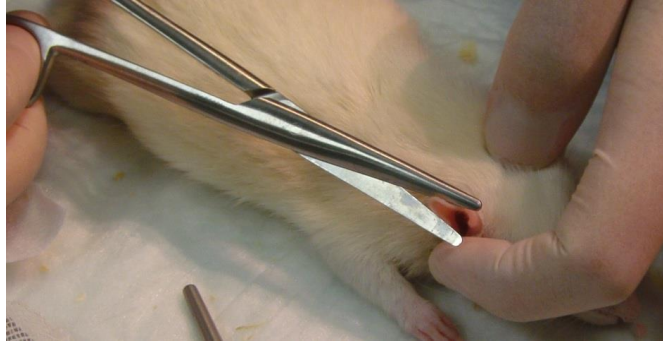


Resim 3.1: Sıçanların yerleştirildiği kafesler

Sıçanların işaretlenmesi için, her kafesteki hayvanlardan birinin kulakları kesilmemiş, diğer üç hayvandan birinin sağ, diğerinin sol kulağı kesilmiş, son hayvanın ise her iki kulağı kesilmiştir (Resim 3.2).

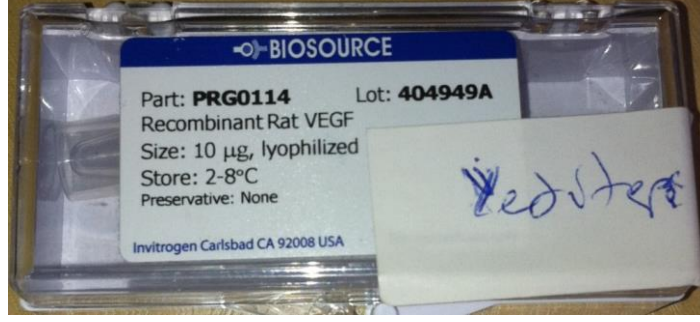
Hayvanların Deney Protokolünden Çıkartılma Ölçütleri

1. Vücut ağırlığının %15'inden fazla kilo kaybı
2. Davranış bozukluğu
3. Düzgün gıda ve su alamama
4. Uyarılara belirgin derecede azalmış yanıt verme
5. Veteriner hekimin uygun görmesi (insani nedenler).



Resim 3.2: Sıçan kulağının kesilmesi

Tüm hayvanlarda beş gün süreyle deneysel üst çene genişletmesi yapılması planlanmıştır. Ortodontik diş hareketinin ve üst çene genişletmesinin gerçekleştirildiği 30 hayvandan 6 tanesi VEGF, 6 tanesi AuNP, 6 tanesi VEGF ve AuNP karışımı, diğer 6 tanesi oligonükleotid ile konjuge edilmiş AuNP ve son 6 tanesi ise kontrol grubunu oluşturmaktadır. 13 nm boyutunda küresel AuNP'lar Turkevich Metodu (200) ile hazırlanarak, oligonükleotid ile konjuge edilmiş ve VEGF ile bağlanmıştır. Kontrol grubunda izotonik serum fizyolojik kullanılmıştır. Çalışmada 0,4 mg/ml AuHCl₄ kullanılmış ve 1ml AuNP, 42ng/ml VEGF ile konjuge olmuştur.



Resim 3.3: Rekombinant Sıçan VEGF

Çalışmada aşağıdaki malzemeler kullanılmıştır:

- Ortodontik 0,014 inçlik paslanmaz çelik tel (American Orthodontics, A.B.D.)
- Steril insülin enjektörü 2 cc (Hayat A.Ş., Türkiye)
- Serum Fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter A.Ş., Türkiye)
- Ketazol® (Richter Pharma AG, Wels – Avusturya)
- Rompun® (Bayer, Almanya)
- Doku örneği kapları (Fırat Plastik, Türkiye)
- Komet elmas frez (Ref: 8392314016, Lemgo, Almanya)
- Dijital Kaliper (Absolute Digimatic, Mitutoyo, A.B.D.)
- 0,45 µm por çapı bulunan filtre (Merck Millipore, A.B.D.)
- Polilysin lam ve lamel (Thermo Scientific, Menzel Glaser, Almanya)
- JEOL-2100 HR-Transmisyon Elektron Mikroskobu 200kV (Jeol, A.B.D.)
- CCD Dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, USA),
- ATI FireGL görüntü yakalama kartı (Advance Micro Device, Camberly, UK)
- Bilgisayar kontrollü Ludl X-Y-Z motorize preparat tablası (Bioprecision, 35 Howtrone, NY, USA),
- Mikrokator (Heidenhein, Traunreut, Germany),
- Leica 4000B ışık mikroskobu (Leica, Wetzlar, Germany)
- Sterio Investigator 7,5 programı (Microbrightfield, Williston, VT, USA)

Çalışmada kullanılan kimyasallar:

- Altın nano parçacık
- %0.01'lik Tetrachloroaurik(III) asit çözeltisi (Fluka-Sigma Aldrich, A.B.D.)
- %1'lik Sodyum sitrat çözeltisi (Merck, A.B.D.)
- Seyreltilmiş Sodyum hidroksit tampon çözeltisi (Sigma Aldrich, A.B.D.)
- Saf su
- Tiyol modifiye oligonükleotid (HS-(CH₂)₆TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT) (Alpha DNA, Kanada)
- VEGF-165 (Biosource, A.B.D.)

3.2. Yöntem

3.2.1 AuNP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu

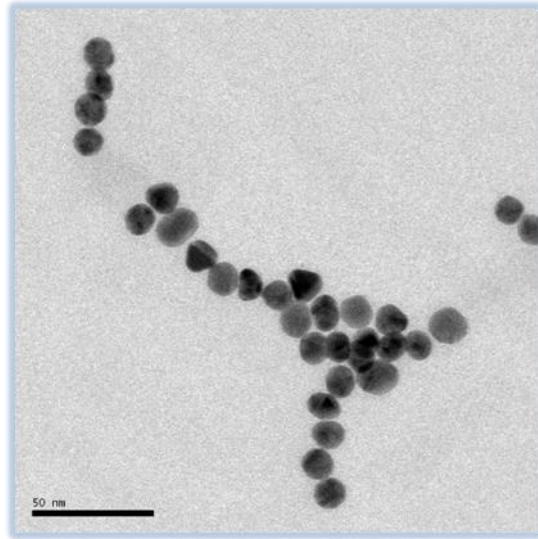
Çalışmada Turkevich ve ark.'nın (198) yöntemi kullanılarak 13nm boyutunda AuNP'lar elde edildi.

0,1 g HAuCl₄ (Fluka-Sigma Aldrich, A.B.D.) 250 ml saf H₂O içerisinde çözüldü ve 300°C derecede kaynatıldıktan sonra 1000 rpm'de santrfüj edildi. Santrfüj edilen 250 ml distile H₂O içerisine 0,285 g sodyum sitrat (3,88 mM) 0,22 nm por çaplı filtreler kullanılarak ilave edildi ve 15 dk kaynatıldı. Çözelti 0,45 µm por çaplı filtreden süzüldü.

100 ml %0.01'lik (ağırlık yüzdesi) tetrakloroaurat asidi çözeltisi (Fluka-Sigma Aldrich, A.B.D.), 5 ml %1'lik (ağırlık yüzdesi) sodyum sitrat çözeltisi (Merck, A.B.D.) ile geri soğutucu altında kaynatıldı. Sitrat iyonları tarafından altın iyonları 5 dakika içerisinde indirgeni; ancak çözelti toplamda 30 dakika kaynatıldı ve oda sıcaklığına kadar soğuması beklendi. Seyreltilmiş sodyum hidroksit tampon çözeltisi (Sigma Aldrich, A.B.D.) kullanılarak sitrat kaplı altın nanoparçacık çözeltisinin pH'ı 7,4'e

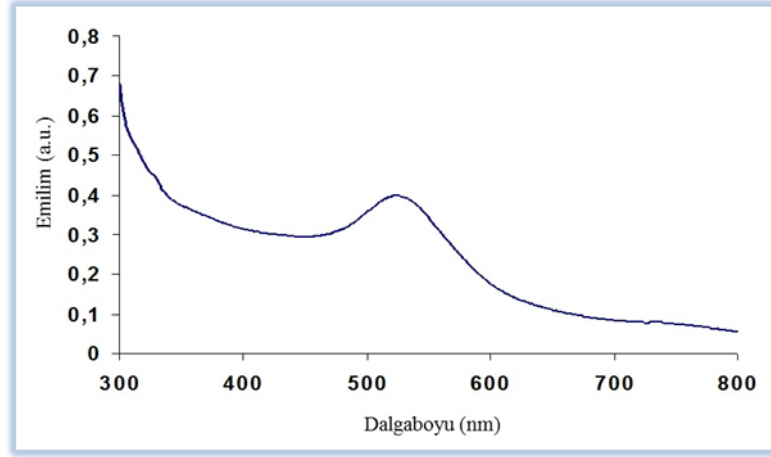
ayarlandı. Yığılmış NP'ları uzaklaştırmak için AuNP çözeltisi, 0,45 µm por çapı bulunan filtrelerden süzüldü. Süzüntü 4°C'de çökelmeden saklanabilmektedir. AuNP çözeltisi 13500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı çözelti, AuNP çözeltisinden uzaklaştırıldı; kalan ortalama 13 nm boyutundaki AuNP'lar ultra saf su ile istenilen konsantrasyonda hazırlandı.

Hazırlanan AuNP'lerin transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (JEOL-2100 HR-TEM, 200 kV, LaB6 filament, A.B.D.) görüntüleri alındı. AuNP'lerin TEM görüntüsü Resim 3.4.'te gösterilmektedir.

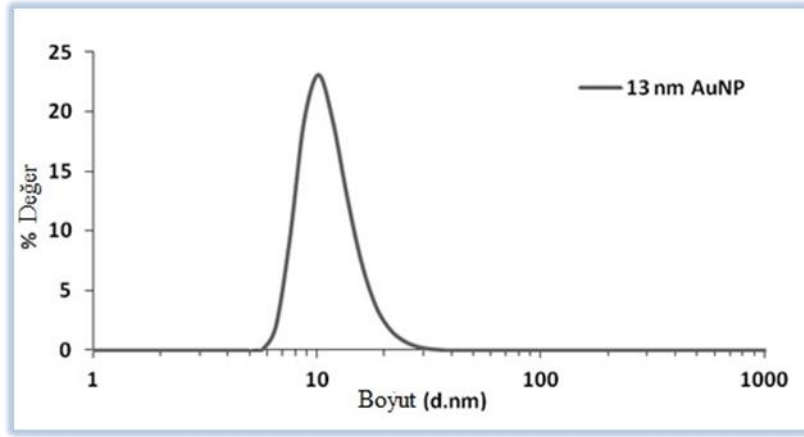


Resim 3.4: AuNP'lerin TEM görüntüsü. Bar: 50nm

Çalışmada kullanılan AuNP'lerin UV/Vis (Spektrometre bilgileri) ve DLS spektrumları Şekil 3.1. ve 3.2.'de sırasıyla gösterilmiştir. Her iki spektrumda 13 nm çapındaki AuNP'lar için oldukça tipiktir.



Şekil 3.1: AuNP'lerin UV/Vis spektrumu



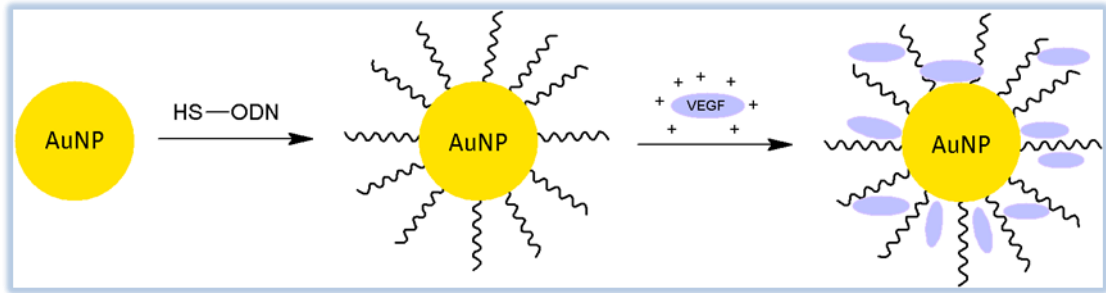
Şekil 3.2: Sentezlenen AuNP'lerin hidro-dinamik çapı

3.2.2. AuNP'lerin Yüzeylerinin Oligonükleotid (ODN) ile İşlevselleştirilmesi ve VEGF Yüklenmesi

Proteinlerin hücre içerisine alınmaları oldukça zordur. Bu nedenle bir taşıyıcı aracılığıyla hücre içerisine gönderilebilmeleri gerekmektedir. VEGF moleküllerinin pozitif yüzey yüküne sahip oldukları bilinmektedir. Bu nedenle AuNP'lerin yüzeyi oldukça negatif bir yüke sahip olan oligonükleotidlerle kaplanması hedeflenmiştir. AuNP-oligonükleotid olarak hazırlanan yapıların yüzeyine pozitif yüzey yüklü VEGF lerin fiziksel olarak yüklenmeleri hedeflenmiştir.

Hazırlanan AuNP'ler, yüzeylerine oligonükleotid kimyasal olarak bağlanmış ve VEGF yüklenmiş AuNP'ler UV/Vis Spektroskopi ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS) teknikleriyle karakterize edilmiştir.

1,5 ml AuNP süspansiyonuna 5 µl tiyol ile modifiye edilmiş ODN ilave edilmiştir ve titreşim cihazında 1 gece konjuge olmaları beklenmiştir. ODN ile modifiye edilmiş olan her 1 ml AuNP süspansiyonunda son VEGF derişimi 42 ng/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon 2 gün boyunca takip edilip yapısında bir değişiklik olup olmadığı izlenmiştir. Resim 3.5, AuNP-ODN+VEGF yapısının hazırlanışını göstermektedir.



Resim 3.5: 13nm boyutundaki AuNP'lere Oligonükleotid bağlanması.

AuNP'ler, yüzeylerine absorbe olmuş sitrat iyonları sebebi ile net bir negatif yüke sahiptir. Oligonükleotidlerin (ODN) üzerindeki negatif yüklü fosfat grupları sebebi ile negatif yüklü AuNP'ler ODN ile işlevselleştiğinde ikisi birlikte, elektriksel olarak daha negatif olmaktadır. AuNP'ların ODN ile işlevselleştirilmesinden ve VEGF ile elektro-statik yüklenmelerinden sonra AuNP'ların zeta-potansiyellerinde ilk 24, 48 ve 72 saatlerde pozitif yönde değişim görülmektedir.

AuNP'ların ODN ile işlevselleştirmesinden sonra hacimsel olarak AuNP'larda ciddi bir büyüme gözlemlenmezken VEGF'nin AuNP+ODN'ye yüklenmesinden sonra belirgin hacimsel artış UV/Vis spektrumunda görülmektedir.

VEGF, AuNP+ODN'ye yüklendikten sonra AuNP'lerin hidrodinamik çaplarında artış gözlemlenmiştir. Yapılan DLS analizinde, AuNP+ODN konjugasyonuna VEGF yüklemesinin en yüksek konjugasyon kapasitesinin 1. ve 2. günlerde olduğu görülmüştür. VEGF'nin konjugasyon değeri 1. günden sonra değişmemiştir.

1 ml AuNP, optimum olarak 42ng/ml VEGF ile konjuge olabilmektedir. Bu, VEGF konsantrasyon değerinden daha yüksek değerlerde AuNP'nin yüzey yükünde ve hidro-dinamik çapında bir değişiklik olmamaktadır. Bu sebeple her 0,4 mg/ml HAuCl₄'e 42 ng/ml VEGF eklenmiştir.

Teorik olarak 1 VEGF molekülü, 38,4 kDa = 15,1 nm boyutundadır. Her bir 13 nm boyutundaki AuNP'nin etrafına bu boyutta kaç tane VEGF molekülünün bağlanabileceği, AuNP'nin yüzey alanı $4\pi r^2$ formülü kullanılarak hesaplanıp VEGF molekülünün boyutuna bölerek bulunabilmektedir.

$$4\pi r^2 = 4 \times 3,14 \times 6,5 \times 6,5 = 530,66$$

530,66 /15,1 nm = 35,14 adet VEGF molekülünün her bir AuNP'nin etrafında bulunabileceğini düşünebiliriz. Her 1 ml AuNP süspansiyonunda 2×10^{11} adet nano-parçacık bulunmaktadır. Bu hesaba göre teorik olarak her 1 ml süspansiyonda yaklaşık 7×10^{12} adet VEGF molekülü bulunmaktadır.

3.2.3. Oligonükleotid-AuNP'lerin *In-Vitro* Sیتotoksitesitesi

Nanotaşıyıcıların ilaç taşıma ve salınımı uygulamalarında kullanımları için toksisitelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada, WST-1 (hücre proliferasyon analizi) kullanılarak, AuNP, AuNP-ODN, AuNP+VEGF (ODN ve inkübasyon süresi olmaksızın), AuNP-ODN+VEGF konjugatlarının hücre büyümesi üzerine toksik etkileri incelendi.

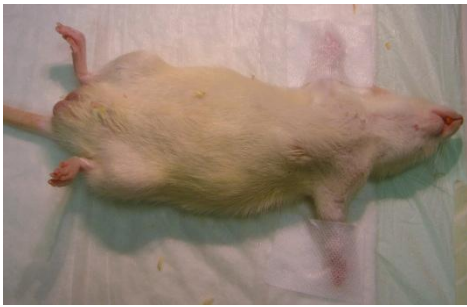
Osteoblast hücreleri 96 kuyucuklu tabakalarda F12 medyum kullanılarak inkübatörde kalte edildi (37°C, %5 CO₂). Hazırlanan AuNP'ler, AuNP-ODN, VEGF, ortamda ODN olmadan hazırlanan AuNP-VEGF karışımı ve hazırlanan konjugatlar kuyucuklara eklendi. Bunların bulunduğu ortamlarda, hücrenin varlığını sürdürebilmesinin test edilmesi için WST-1 yapıldı. Oluşan formazan ürününün abzorbansı 450 nm'de her bir örnek için ölçülerek toksisite değerleri belirlendi.

3.2.4. Hayvan Deneyi

Çalışma boyunca herbiri yaklaşık 250 gr ağırlığında ve 14 haftalık olan 30 adet Wistar sıçanı polikarbonat kafeslerde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngü içerisinde 23±2°C de istediği kadar su ve yem ile beslenmiştir.

Hızlı Üst Çene Genişletmesi

Sıçanlar, 60 mg/kg/im dozunda Ketazol® %10 (Richter Pharma, Avusturya) (1ml'sinde 100 mg ketamin hidroklorür içerir) ve 5 mg/kg/im dozunda Rompun® %2 (Bayer, Almanya) (1ml'sinde 23,32 mg ksilazin içerir) uygulanarak anestezi altına alınmıştır (Resim 3.6a, 3.6b).



Resim 3.6a: Anestezi uygulaması

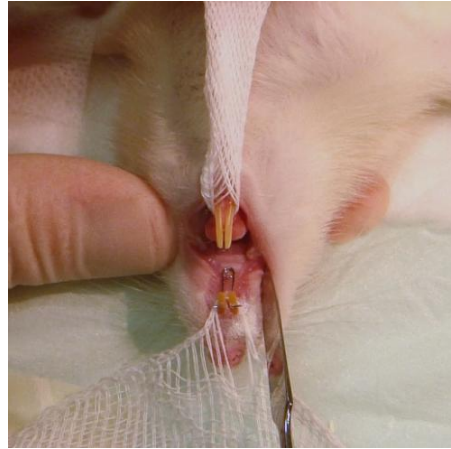
Resim 3.6b: Sıçan mandibulasının ekartasyonu

Herbir sıçan tartılmış ve ağırlığı kayıt edilmiştir. Üst çene genişletmesi sağlamak amacıyla tüm sıçanların üst kesici dişlerine vestibül-palatinal yönde delikler ince uçlu

yüzeyi elmas kaplı frezler (Komet, Lemgo, Almanya) kullanılarak açılmıştır (Resim 3.7) ve açılan deliklerden 0,14 inç kalınlığında telden bükülmüş heliksli genişletme apareyleri geçirilerek dişlere akışkan kompozit ile sabitlenmişlerdir (Resim 3.8).



Resim 3.7: Sıçan dişlerine delik açılması

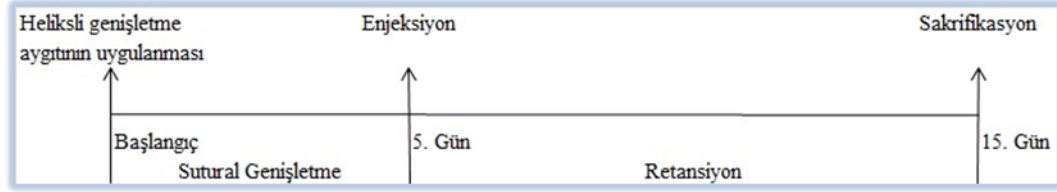


Resim 3.8: Sıçanların dişlerine heliksli genişletme aygıtı yerleştirilmesi

Sıçanların üst çenelerinin genişletilmesinin beşinci gününde sıçanlar, deneyin başında kullanılan dozda anestezi maddeyle ve aynı yöntem kullanılarak anestezi altına alınmıştır. Herbir sıçan tartılmış ve her birinin ağırlığı kayıt edilmiştir. Sıçanların ön kesici dişlerinin arasında açılan mesafe dijital kaliper ile aynı gözlemci tarafından enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası iki kez ölçülmüştür.

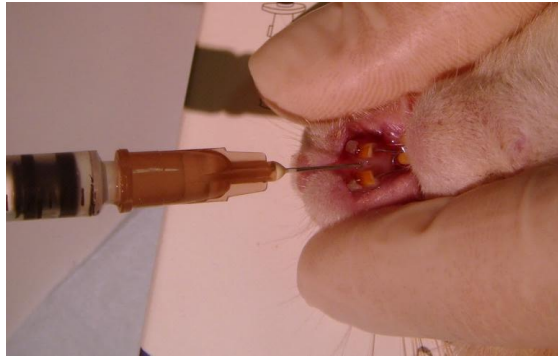
Enjeksiyon

Sıçanlara deney gruplarına göre VEGF, AuNP-VEGF karışımı, AuNP-ODN-VEGF, Serum Fizyolojik ve AuNP enjeksiyonu yapılmıştır. Deney akışı içerisinde enjeksiyon programı Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3: Enjeksiyon programı

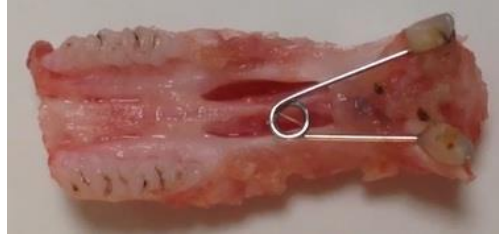
Sıçanların palatinal mukozalarının altına, enjektörün ucu iki kesici dişin aralandığı alveoler mukozadan girecek şekilde 0.2'şer ml enjeksiyon kademeli olarak yapılmıştır ve enjektör palatinal mukozadan çıkartılmadan önce beş dakika beklenmiştir (Resim 3.9). Enjektör palatinal mukozadan çıkartıldığı zaman enjektörün giriş yerinden uygulanan solüsyonun geriye çıkmadığı kontrol edilmiştir.



Resim 3.9: Palatal mukozal enjeksiyon

Sıçanlara uygulanan enjeksiyonun onuncu gününde sıçanlar tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Kesici dişleri arası mesafe dijital kaliper yardımı ile aynı araştırmacı tarafından ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Deneyin başlangıcından 15 gün (5 gün üst çene genişletmesi + 10 gün enjeksiyon sonrası dönem) sonra sıçanlar, yüksek dozda anestezi uygulanarak sakrifiye edilmiştir. Ardından yumuşak dokular diseke edilmiş, hayvanların üst çeneleri, cerrahi makas kullanılarak çıkartılmıştır (Resim 3.10). Dokular, +4 °C’de, %10’luk nötral formaldehit solüsyonu içeren doku kaplarına alınmıştır.



Resim 3.10: Disseke edilmiş sıçan maksillası

3.2.5. Histolojik Araştırma

Fiksasyon aşaması bittikten sonra dokular Morse solüsyonunda (%10 sodyum sitrat ve %22,5 formik asit) 4 hafta boyunca dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyon boyunca, solüsyon haftada 3 kez değiştirilmiştir. Dekalsifiye olan dokular alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş, bunu takiben de parafine gömülmüştür (Resim 3.11a, 3.11b).



Resim 3.11a: Parafine gömülmüş maksilla

Resim 3.11b: Kesit alınmış parafin blok

Bloklar 1/10 sistematik rastgele örnekleme oranına göre seri olarak kesilmiştir. Kesitler diş kuronlarından kök ucuna doğru 10µm kalınlığında sagittal olarak alınmıştır. Alınan kesitler poly L lysin kaplı lamlara aktarılmıştır. Lamlara alınan kesitler hematoksilin eosin (H.E.) ile boyanarak kapatılmıştır (Resim 3.12).



Resim 3.12: Poly L lysin kaplı lamlara aktarılmış ve Hematoksilin Eosin ile boyanmış kesitler

Boyanan kesitler, CCD dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, A.B.D.), görüntü kartı (ATI FireGL Advance Micro Device, Camberly, İngiltere), bilgisayar kontrollü motorize tabla, (Bioprecision, Howtrone, NY, A.B.D.), histolojik mikro-kesici (Heidenhein, Traunreut, Almanya) ve ışık mikroskobundan (Leica DM 4000B, Wetzlar, Almanya) oluşan stereoloji çalışma istasyonunda incelenmiştir. Ölçümler yukarıda belirtilen mikroskopta Stereoinvestigator 7.5 (Microbrightfield, Williston, VT, A.B.D.) programı kullanılarak yapılmıştır. Hacim ölçümleri için Leica C Plan X10 objektif (NA= 0.22) kullanılmıştır.

Alveol kemiğinin hacminin hesaplanmasında Stereoinvestigator görüntü analiz programının Cavalieri sondasından yararlanılmıştır. “Cavalieri yöntemi”, düzenli bir geometrik şekle sahip olmayan üç boyutlu nesnelere hacimlerinin birbirine paralel dilimlere ayrılarak hesaplanmasına dayanır (230). Bu yöntem ile önce hacmi hesaplanacak yapı, dilimlere ayrılır ve her kesitin yüzey alanı bulunup, kesit kalınlığı ile çarpılarak ilgili dilimin hacmi hesaplanır. Nihayet dilimlerin hacimleri toplanarak ilgilenilen yapının toplam hacmi bulunur. Bu alan içerisindeki tüm yumuşak ve sert

dokuyu ilgilendiren hacim “Total Hacim”, sadece sert dokuyu ilgilendiren hacim “Kemik Hacmi” olarak tanımlanmıştır. Noktalı alan cetvelinin uzunluğu, yapılan pilot ölçüm denemesi ile saptanmıştır ve $d=50 \mu\text{m}$ 'dir. Bu ölçüler ile maksimum ölçüm kalitesine ulaşılmıştır. Noktalı alan ölçüm cetvelinin her bir noktası $2500 \mu\text{m}^2$. Noktalı alan ölçüm cetveli ilgilenilen yapıya rastgele atılmış, keser dişlerden itibaren posteriora doğru molar dişlere kadar olan alanın içerisindeki noktalar sayılmıştır. Sayım sonuçları aşağıda belirtilen formüldeki yerlerine konularak kemik hacmi tahmin edilmiştir:

$$\text{Hacim}_{\text{alveolar kemik}} = t \times a / p \times \sum p$$

t: kesit kalınlığı

a/p: noktalı alan ölçüm cetvelindeki her bir noktanın gerçek alanı

Ölçülen her kesitin hacimleri toplanıp, örnekleme oranı ile çarpılarak keser dişlerden molar dişlere kadar olan bölgenin hacmi hesaplanmıştır

3.3. İstatistiksel Yöntem

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) for Windows 17.0 programı kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık sınır değeri $p<0,05$ olarak alınmıştır. Tüm gruplar için her bir parametrenin tanımlayıcı ortalama (*average*), standart hata (*standart error of mean*, SEM) istatistikleri hesaplanmıştır.

Gruplardaki n sayısı az olmasına rağmen varyansların homojenliği Levene Testi ile belirlenmiştir ($p=0,216$, $p>0,05$). Bu durumda niceliksel verilerin karşılaştırılmasında ikiden fazla grup durumunda, gruplar arası karşılaştırmalarında Tek yönlü (*One way*) ANOVA testi ve gruplar arasındaki farklılığa neden olan grubun belirlenmesinde Tukey ikili karşılaştırma testi kullanılmıştır.

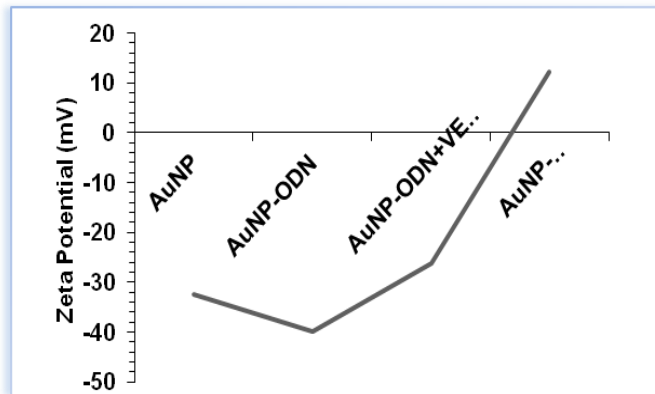
4. BULGULAR

4.1. Fiziko-Kimyasal Bulgular

ODN bağlanmasından sonra ve VEGF yüklenmesinden sonra AuNP'lerin zeta potansiyelleri Tablo 4.1 ve zetapotansiyeli değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi 13nm boyutunda hazırlanan AuNP'ların Zeta-Potansiyel değerleri -32,55 mV ölçülürken, oligonükleotid ile konjuge olmaları ile Zeta-Potansiyel değerleri -39,95 mV'a düşmüştür. AuNP-Oligonükleotid'in 42 ng/ml VEGF ile konjugasyonları sonrasında oluşan yapının elektriksel yükü 24 saat sonra -26,2 mV'a, 48 saat sonra ise +12,1'e yükselmiştir ve bu durum VEGF'nin AuNP-Oligonükleotid ile konjuge olduğunu ifade etmektedir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. AuNP ve konjugatlarının Zeta-Potansiyel Değerleri

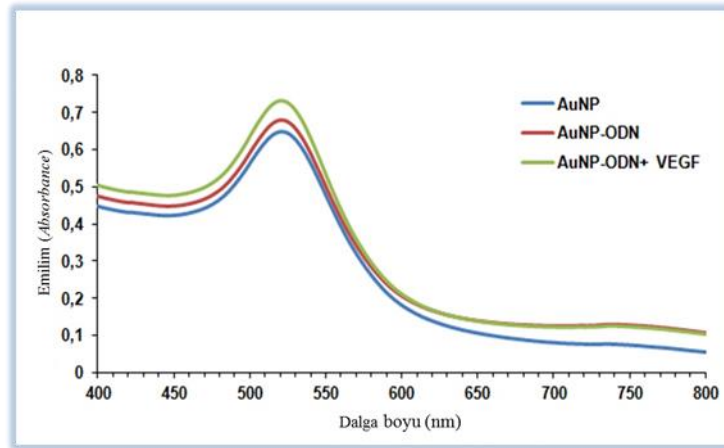
Modifikasyon Öncesi ve Sonrası AuNP	Zeta Potansiyel (mV)
AuNP	-32,55
AuNP-ODN	-39,95
AuNP-ODN+VEGF (24 h)	-26,2
AuNP-ODN+VEGF (48 h)	12,1



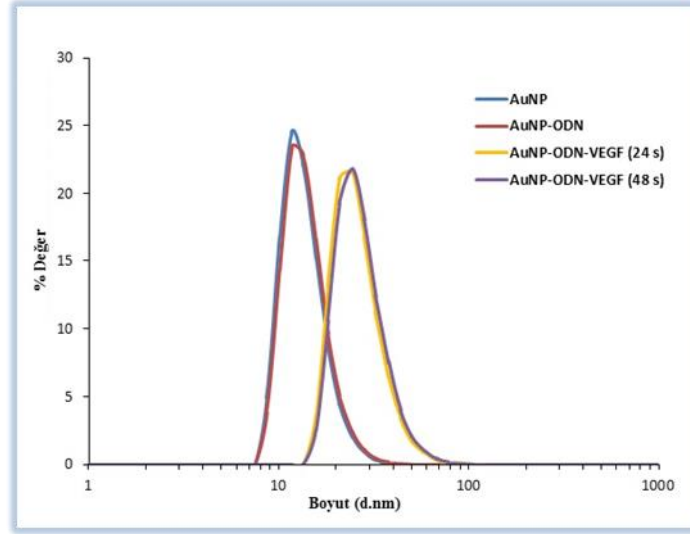
Şekil 4.1: AuNP'lerin ODN ile işlevselleştirilmeleri ve VEGF ile yüklenmeleriyle Zeta potansiyel değişimi

Şekil 4.2. ve 4.3'te AuNP'ler, AuNP'lere ODN bağlandıktan sonra ve VEGF yüklemesi yapıldıktan sonraki UV/Vis spektrumları ve DLS spektrumları verilmiştir. UV/Vis spektrumlarından AuNP'lere ODN bağlanmasından sonra önemli bir büyüme gözlenmezken, VEGF yüklenmesinden sonra 24 nm boyutuna erişilmektedir. Bununla beraber DLS spektrumlarından VEGF eklenmesinden sonra AuNP'lerin büyüklüğünde net bir büyüme gözlenmektedir.

AuNP+ODN, VEGF ile bağlandıktan sonra AuNP'lerin hidrodinamik çapları 24 nm'ye yükselmiştir. Çalışmada elde edilen AuNP'lerin en yüksek yüklenme kapasiteleri 1. ve 2. günlerde gözlemlenmiştir. VEGF'nin ODN+AuNP ile en yüksek konjugasyon kapasitesi 1. günden sonra değişmedi ve nano-taşıyıcıların boyutları sabit kalmıştır. AuNP-Oligonükleotid süspansiyonuna VEGF eklendikten sonra AuNP-ODN+VEGF konjugasyonunun 24. ve 48. saat doygunluğu Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2: AuNP, AuNP-ODN ve AuNP-ODN+VEGF'nin UV/Vis spektrumları



Şekil 4.3: AuNP'lerin DLS analizi (A) ve ODN-AuNP konjugasyonuna VEGF yüklemesinin 1. ve 2. gününün stabilitesi (B)

4.2. Biyolojik Bulgular

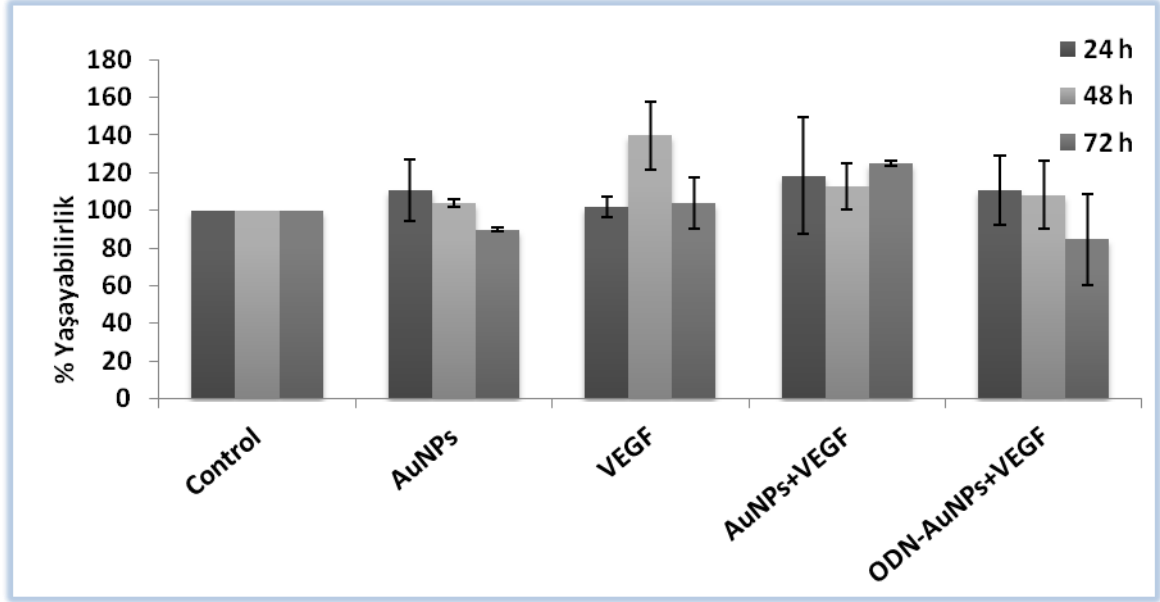
Ortodontik kuvvet uygulanan ve enjeksiyon yapılan sıçanların, deney gruplarına göre deneyin başlangıcındaki ve enjeksiyonun uygulandığı günlerdeki ağırlıklarının ortalamaları Tablo 4.2.'de verilmiştir. Sıçanların ağırlıklarında düşüş görülmemektedir.

Tablo 4.2. Deney ve kontrol gruplarındaki sıçanların deney süresince ağırlıklarının değişimi

Grup Adı	Başlangıç Ağırlığı Ortalaması (gram)	Standart Sapma	Enjeksiyon Ağırlığı Ortalaması (gram)	Standart Sapma	P
Kontrol	240,7	± 26,03	225,8	± 16,83	0,075
AuNP	239,5	± 21,66	232,7	± 23,72	0,058
VEGF	217,2	± 8,08	211,3	± 5,5	0,072
AVEGF	231,5	± 29,15	208,8	± 26,83	0,116
AOVEGF	246,3	± 36,81	242,7	± 32,6	0,345

P<0,05

AuNP, VEGF, AuNP+VEGF ve AuNP-ODN+VEGF' lerin 22 µg/mL AuNP konsantrasyonunda 24, 48 ve 72 saat osteoblast hücreleri ile muamele edilmesi ile elde edilen toksisite değerlendirmesi Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4: AuNP, VEGF, AuNP+VEGF ve AuNP-ODN+VEGF' lerin 22 µg/mL AuNP konsantrasyonunda 24, 48 ve 72 saat osteoblast hücreleri ile muamele edilmesi ile elde edilen toksisite değerlendirmesi.

Data kontrol değerlerine göre normalize edilmiştir ve bu değer %100 hücre yaşayabilirliği olarak ayarlanmıştır. Resimde görüldüğü gibi 72 saat sonunda ODN-AuNP+VEGF sitotoksitesinde bir ölçüde azalma gözlenmiştir.

4.3. Histomorfometrik Bulgular

Ortodontik kuvvetin uygulandığı sıçan üst birinci büyük azı ile ön kesici dişler arasında yer alan üst çene kemiğinin ve yumuşak dokusunun ortalama hacmi ve standart hata payı ANOVA analizi bulguları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Üst çene kemiğinde farklı gruplarda gözlenen ortalama hacim ve standart hata payı oranları, ve gruplar arası anlamlılık değerlerinin gösterildiği ANOVA analiz tablosu

	Gruplar	Ortalama	SH	P
Kemik Hacmi (mm³)	Kontrol	11,417	1,802	0,105
	AuNP	11,581	1,118	
	VEGF	15,654	0,724	
	AuNP-VEGF	10,656	1,274	
	AuNP-Oligonükleotid-VEGF	12,798	1,664	
Yumuşak Doku Hacmi (mm³)	Kontrol	5,505	0,886	0,026*
	AuNP	4,317	0,599	
	VEGF	7,649	0,832	
	AuNP-VEGF	4,271	0,878	
	AuNP-Oligonükleotid-VEGF	4,314	0,873	
Kemik/Total Hacim Oranı Yüzdesi (%)	Kontrol	67,022	2,643	0,328
	AuNP	72,687	2,822	
	VEGF	67,272	2,574	
	AuNP-VEGF	71,661	4,115	
	AuNP-Oligonükleotid-VEGF	74,925	3,512	
Yumuşak Doku/Total Hacim Oranı Yüzdesi (%)	Kontrol	32,978	2,643	0,328
	AuNP	27,313	2,822	
	VEGF	32,728	2,574	
	AuNP-VEGF	28,339	4,115	
	AuNP-Oligonükleotid-VEGF	25,075	3,512	
Total Hacim (mm³)	Kontrol	16,922	2,57	0,025*
	AuNP	15,89	1,31	
	VEGF	23,3	1,15	
	AuNP-VEGF	14,93	1,65	
	AuNP-Oligonükleotid-VEGF	17,11	2,2	

SH: Standart Hata, p<0,05

Farklı gruplarda gözlenen kemik ve yumuşak doku değişimlerinin Tukey istatistiksel analizi Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

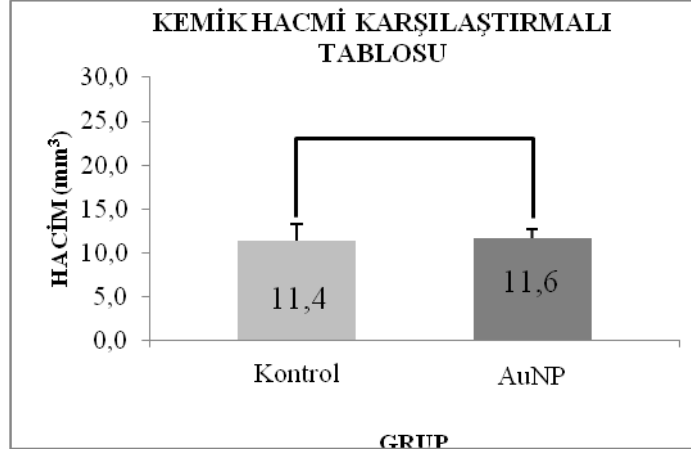
Tablo 4.4: İkili gruplarda karşılaştırılan kemik ve yumuşak doku değişimlerinin Tukey analizi ile belirlenen p değerleri tablosu

	Kemik Hacmi	Yumuşak Doku Hacmi	Kemik Hacmi Oran	Yumuşak Doku Hacmi Oran	Total Hacim
Kontrol & AUNP	1,000	0,845	0,722	0,722	0,995
Kontrol & VEGF	0,217	0,378	1,000	1,000	0,136
Kontrol & AuNP+VEGF	0,995	0,847	0,861	0,861	0,946
Kontrol & AuNP+ODN+VEGF	0,951	0,843	0,428	0,428	1,000
AUNP & VEGF	0,210	0,046*	0,721	0,721	0,046*
AUNP & AuNP+VEGF	0,989	0,996	0,999	0,999	0,996
AUNP & AuNP+ODN+VEGF	0,963	0,988	0,985	0,985	0,988
VEGF & AuNP+VEGF	0,106	0,057	0,866	0,866	0,028*
VEGF & AuNP+ODN+VEGF	0,541	0,046*	0,412	0,412	0,125
AuNP+VEGF & AuNP+ODN+VEGF	0,800	1,000	0,950	0,950	0,915

P<0,05

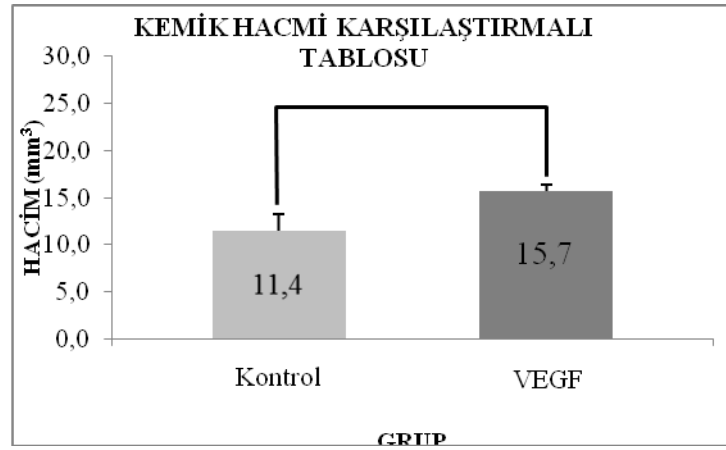
Gruplar arası karşılaştırma 2'li gruplar halinde incelendiğinde elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir:

Kontrol ve AuNP grupları arasında ölçülen kemik hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p>0,05) (Şekil 4.5)



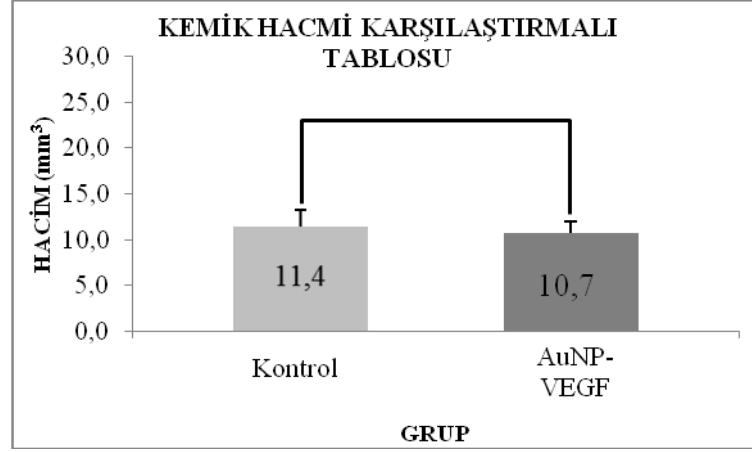
Şekil 4.5: Kontrol ve AuNP grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde, VEGF grubunda ölçülen kemik hacim miktarı kontrol grubunda gözlenen kemik hacim miktarından daha fazla olduğu görülmüştür; ancak istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.6).



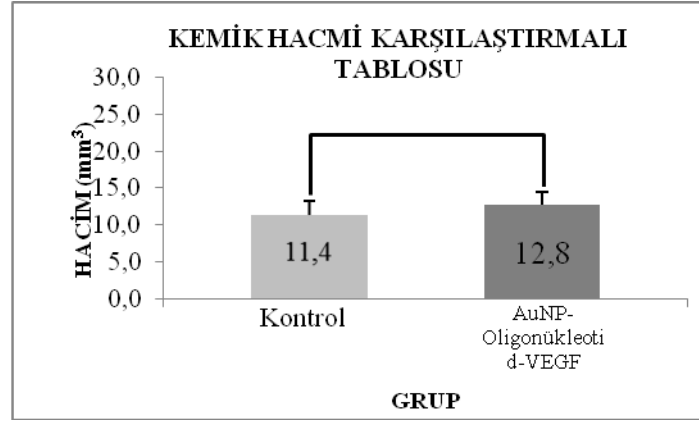
Şekil 4.6: Kontrol ve VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde, gruplar arasında ölçülen kemik hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.7)



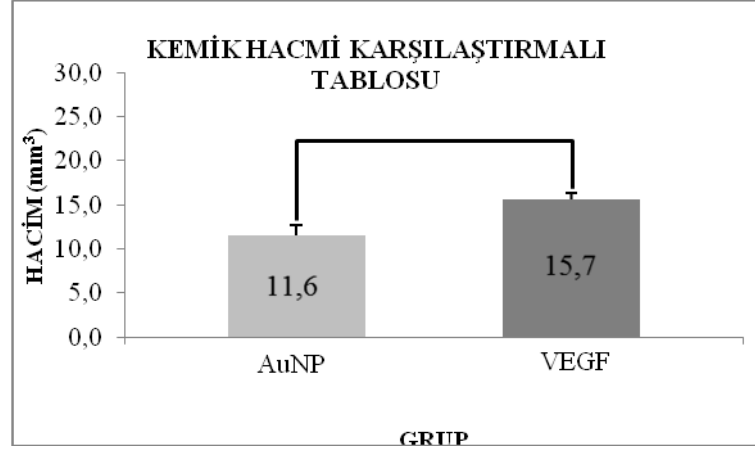
Şekil 4.7: Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde grupları arasında ölçülen kemik hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Ancak gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.8)



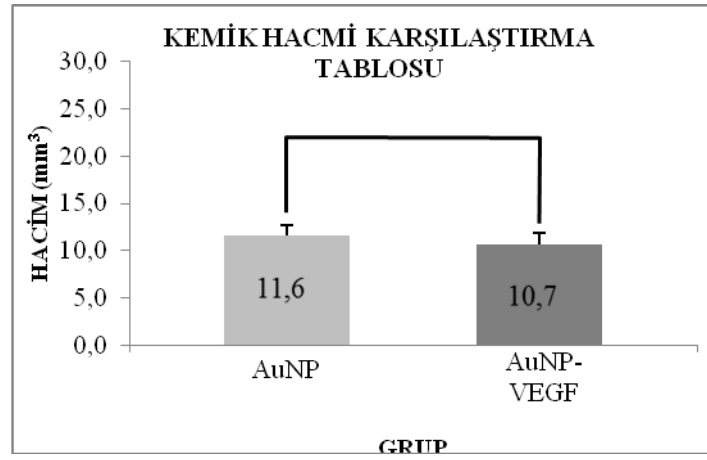
Şekil 4.8: Kontrol ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen kemik hacim miktarı AuNP grubunda gözlenen kemik hacim miktarından daha fazladır. Ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.9).



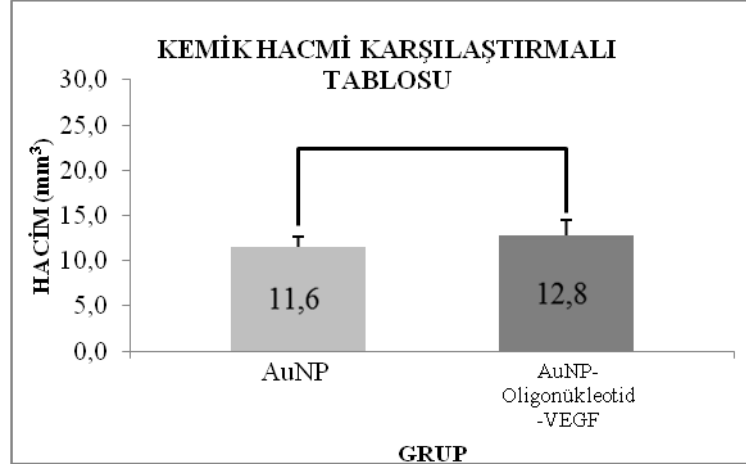
Şekil 4.9: AuNP ve VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.10)



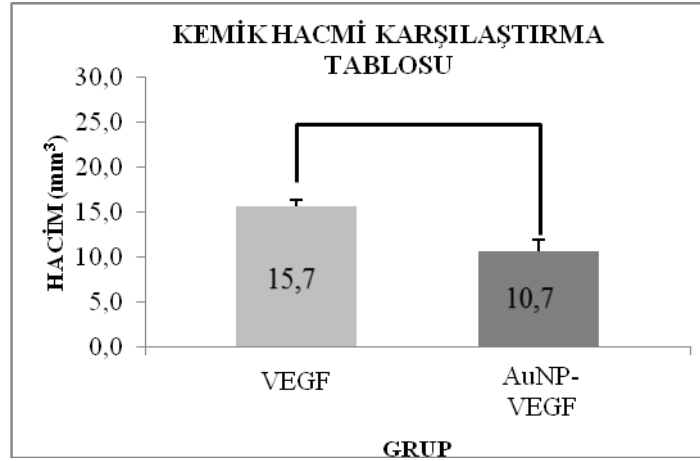
Şekil 4.10: AuNP ve AuNP+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.11)



Şekil 4.11: AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

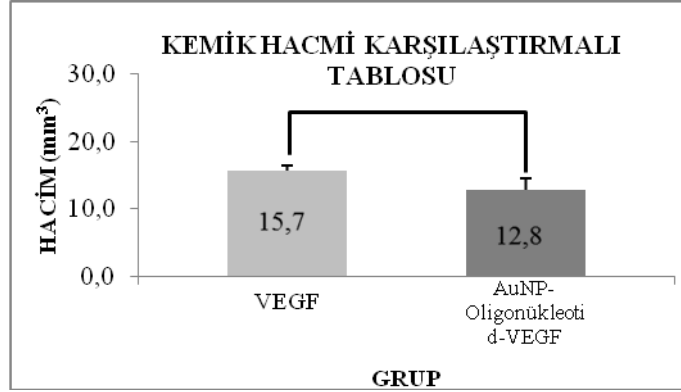
VEGF ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde, VEGF grubunda ölçülen kemik hacim miktarı AuNP+VEGF grubunda gözlenen kemik hacim miktarından daha fazla olduğu görülmüştür; ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.12)



Şekil 4.12: VEGF ve AuNP+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

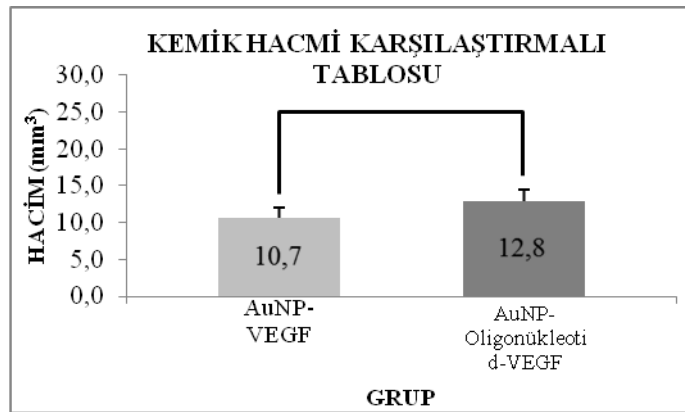
VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde, VEGF grubunda ölçülen kemik hacim miktarı AuNP-Oligonükleotid-VEGF grubunda gözlenen kemik hacim miktarından daha fazla olduğu

görülmüştür; ancak istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.13).



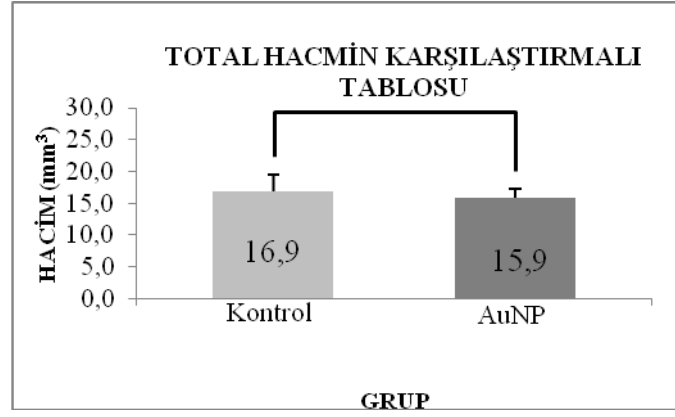
Şekil 4.13: VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

AuNP+VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik hacim miktarı incelendiğinde, AuNP+VEGF grubunda ölçülen kemik hacim miktarı AuNP+Oligonükleotid+VEGF grubunda gözlenen kemik hacim miktarından daha az olduğu görülmüştür; ancak istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.14).



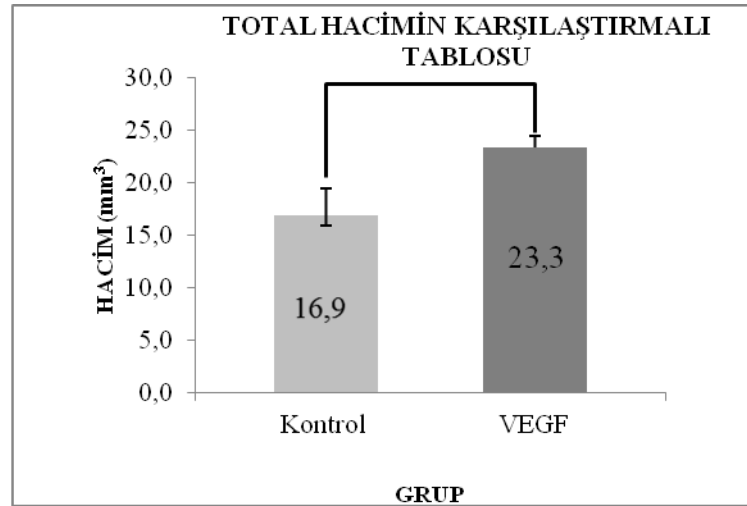
Şekil 4.14: AuNP+VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP grupları arasında ölçülen total hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.15)



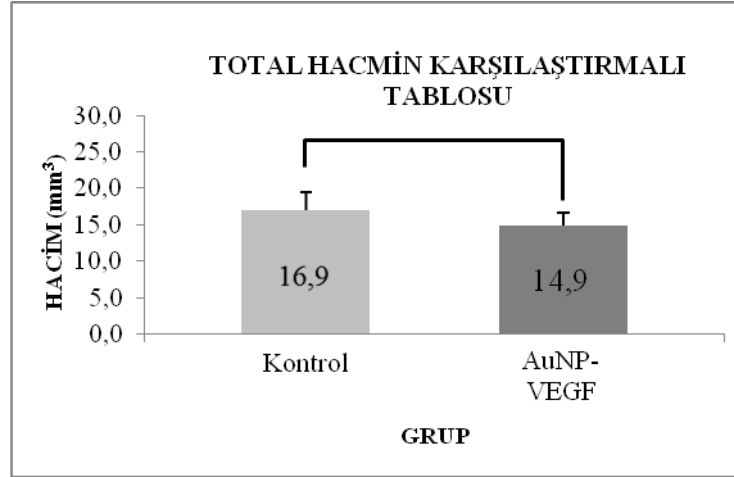
Şekil 4.15: Kontrol ve AuNP grupları arası total hacmin karşılaştırması

Kontrol ve VEGF grupları arasında ölçülen total hacim miktarı incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen total hacim miktarı kontrol grubunda gözlenen total hacim miktarından daha fazladır. Ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.16).



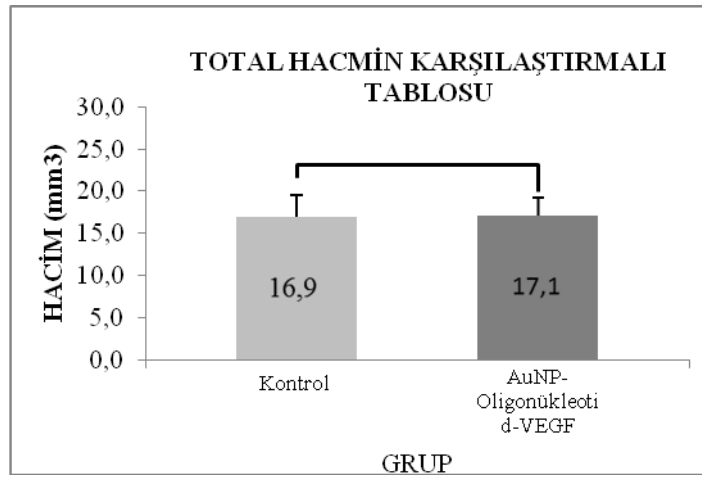
Şekil 4.16: Kontrol ve VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.17)



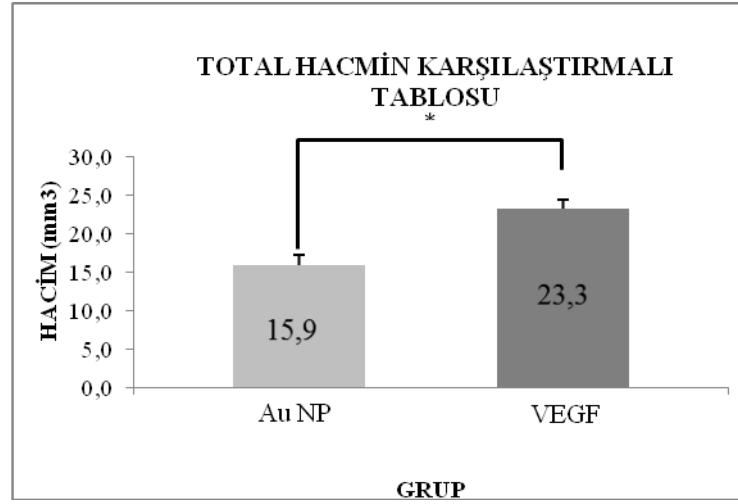
Şekil 4.17: Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.18).



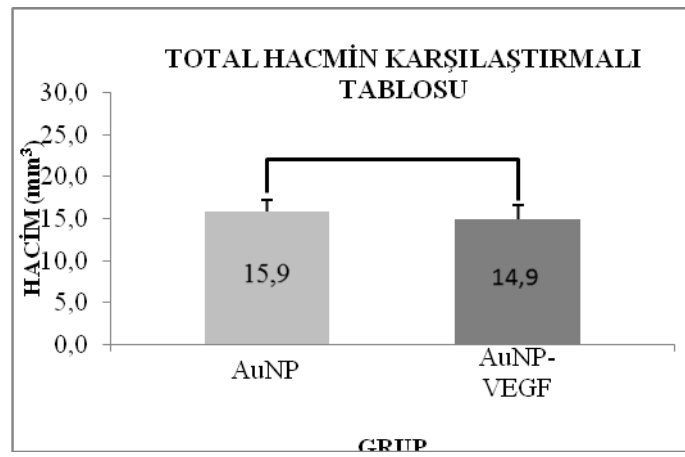
Şekil 4.18: Kontrol ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

AuNP ve VEGF grupları arasında ölçülen total hacim miktarı incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen total hacim miktarı AuNP grubunda gözlenen total hacim miktarından daha fazladır. İstatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmıştır ($p=0,046$) ($p<0,05$) (Şekil 4.19)



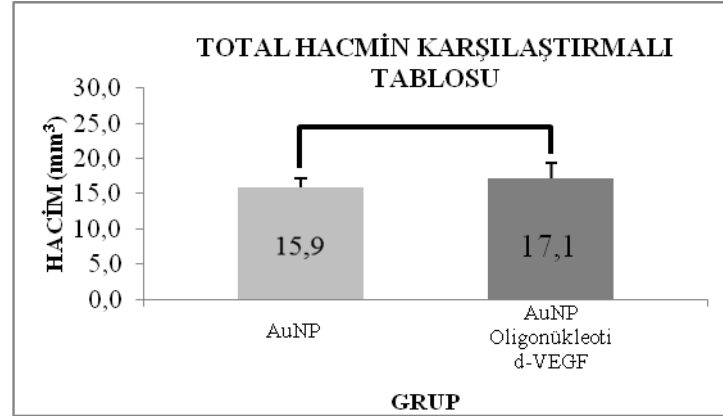
Şekil 4.19: AuNP ve VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

AuNP ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.20).



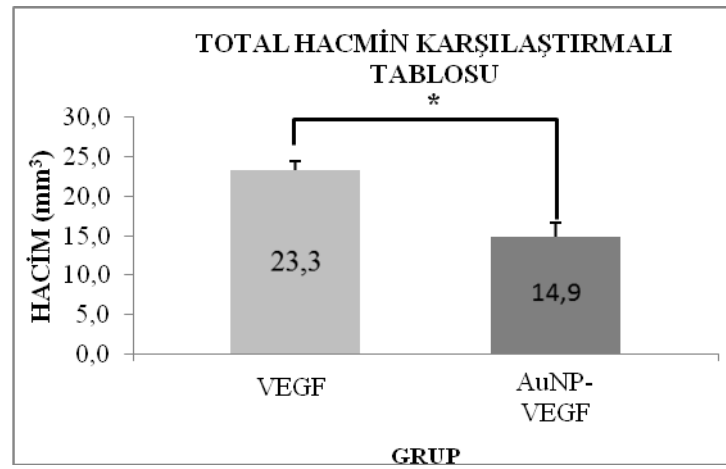
Şekil 4.20: AuNP ve AuNP+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

AuNP ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim değerleri benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.21).



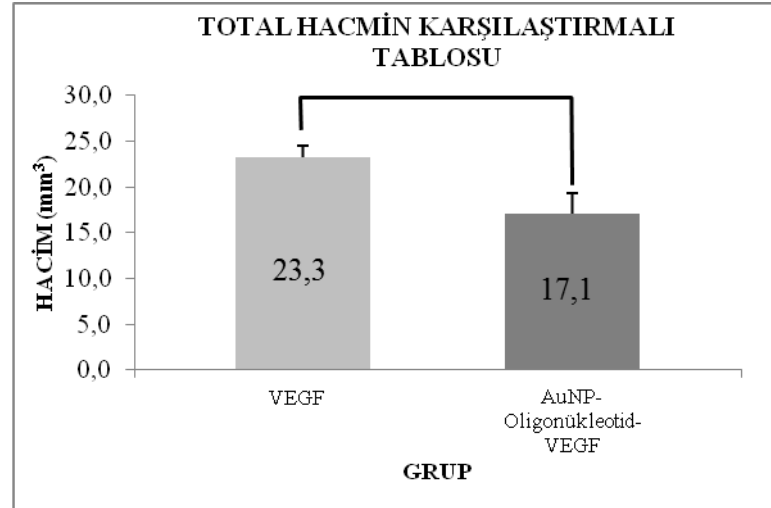
Şekil 4.21: AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

VEGF ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim miktarı incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen total hacim miktarı AuNP+VEGF grubunda gözlenen total hacim miktarından daha fazladır. İstatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmıştır ($p=0,028$) ($p<0,05$) (Şekil 4.22)



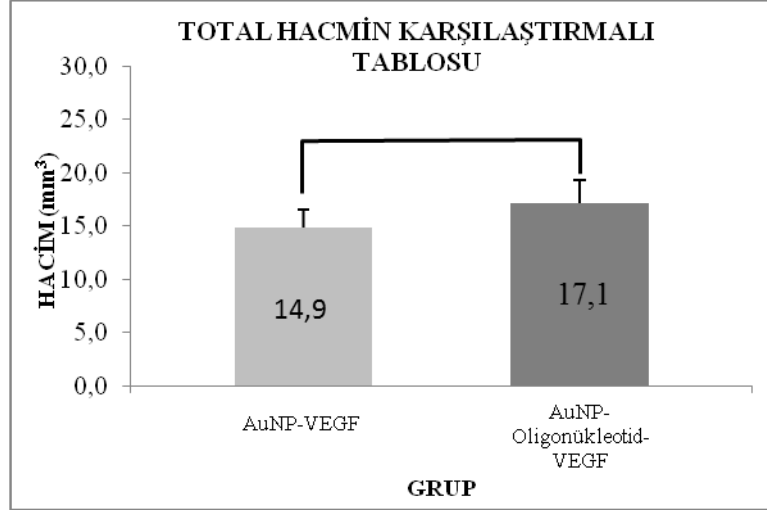
Şekil 4.22: VEGF ve AuNP+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim miktarı incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen total hacim miktarı AuNP+Oligonükleotid+VEGF grubunda gözlenen total hacim miktarından daha fazladır; ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.23.).



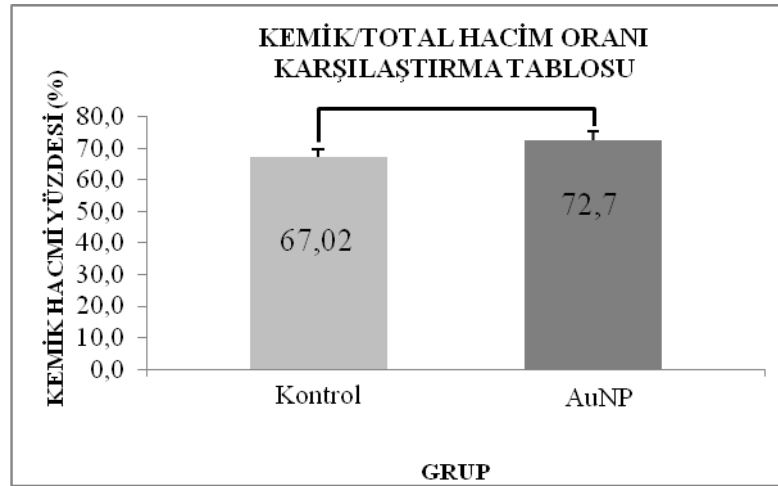
Şekil 4.23: VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

AuNP+VEGF ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen total hacim miktarı incelendiğinde AuNP-Oligonükleotid+VEGF grubunda ölçülen total hacim miktarı AuNP+VEGF grubunda gözlenen total hacim miktarından daha fazladır; ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.24.)



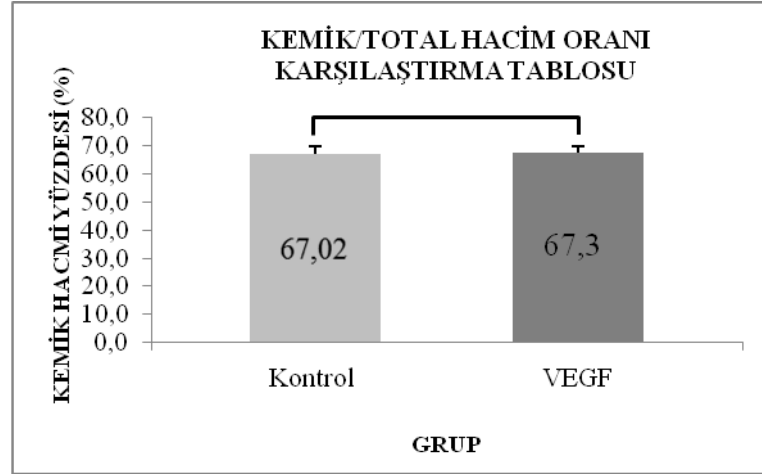
Şekil 4.24: AuNP+VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arası total hacmin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.25.).



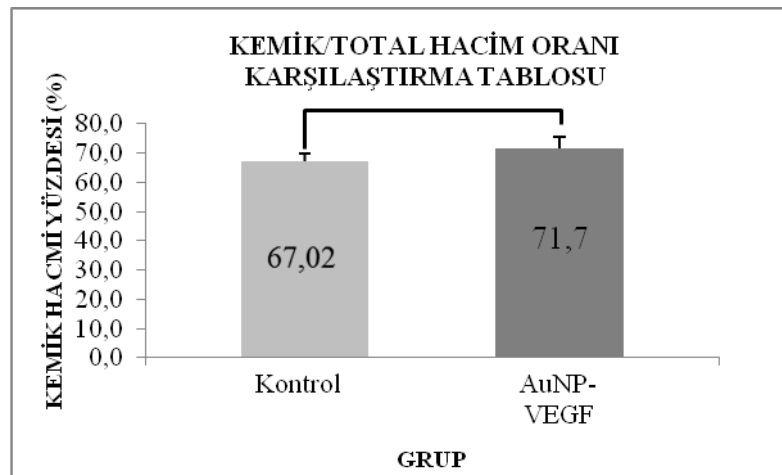
Şekil 4.25: Kontrol ve AuNP grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.26.).



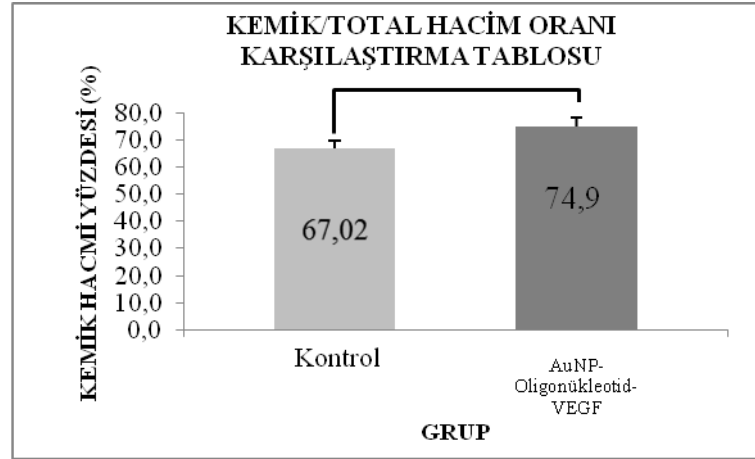
Şekil 4.26: Kontrol ve VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.27).



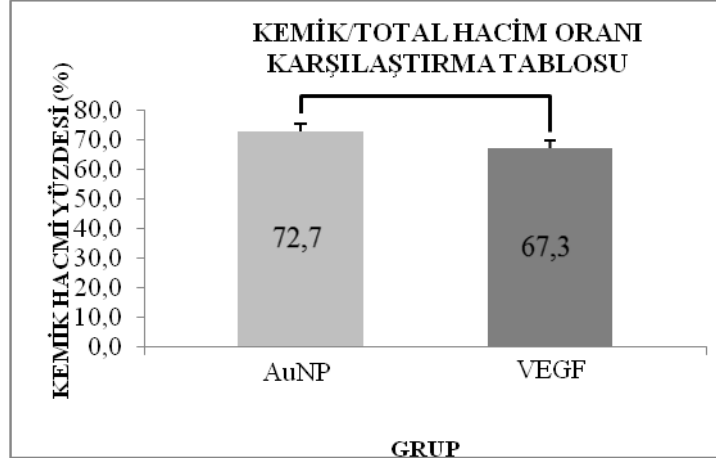
Şekil 4.27: Kontrol ve AuNP+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

Kontrol ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranı incelendiğinde kontrol grubunda ölçülen kemik/total hacim oranı AuNP-Oligonükleotid+VEGF grubunda gözlenen kemik/total hacim oranından daha azdır. Ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.28.).



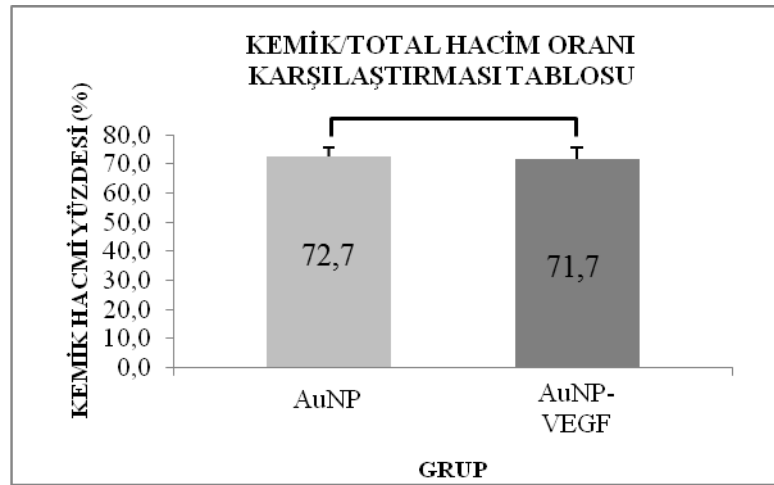
Şekil 4.28: Kontrol ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total kemik hacim oranı incelendiğinde AuNP grubunda ölçülen kemik/total hacim oranı VEGF grubunda gözlenen kemik/total hacim oranından daha fazladır; ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.29.).



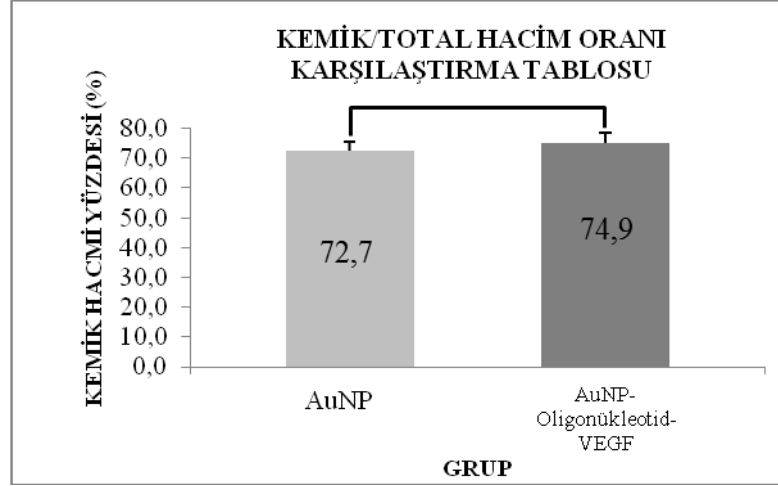
Şekil 4.29: AuNP ve VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.30.).



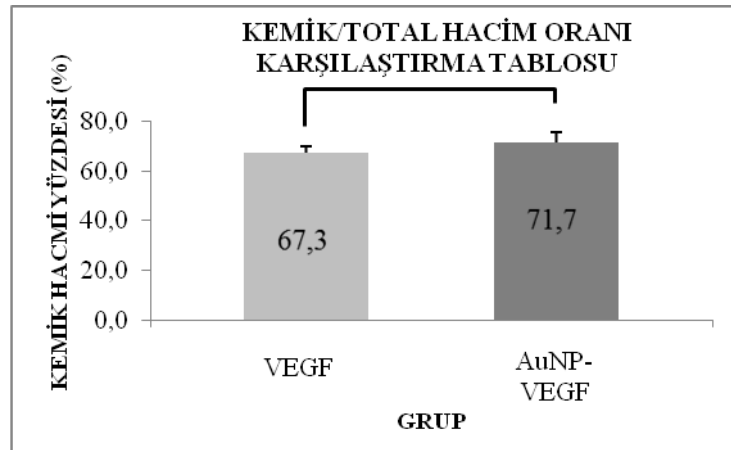
Şekil 4.30: AuNP ve AuNP+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.31.).



Şekil 4.31: AuNP ve AuNP-Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

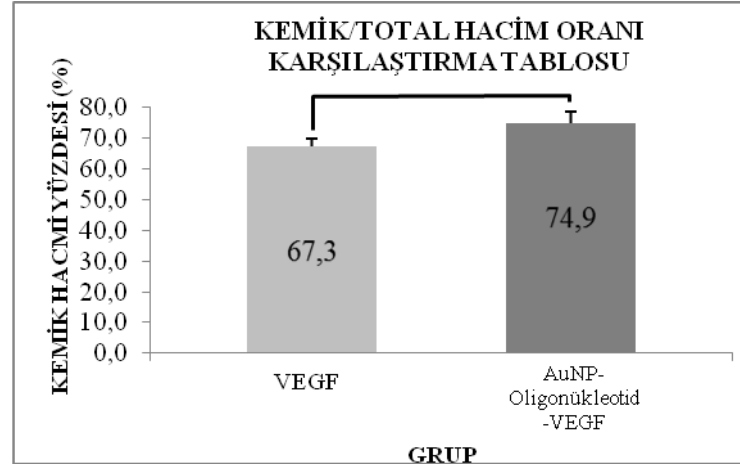
VEGF ve AuNP+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.32.).



Şekil 4.32: VEGF ve AuNP+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

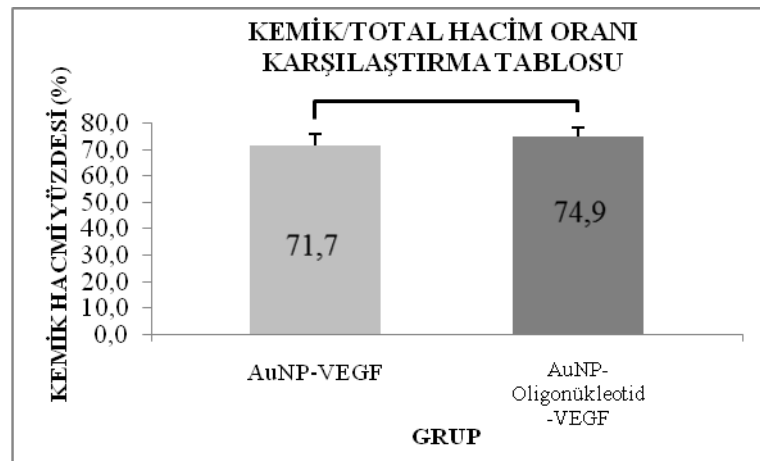
VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranı incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen kemik hacim miktarı AuNP-

Oligonükleotid+VEGF grubunda gözlenen kemik/total hacim oranından daha fazladır. Ancak istatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.33.)



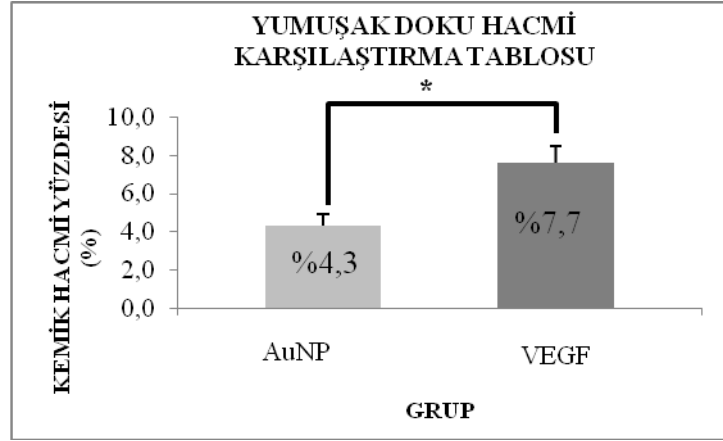
Şekil 4.33: VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

AuNP+VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arasında ölçülen kemik/total hacim oranları benzerlik göstermektedir. Buna karşılık gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.34).



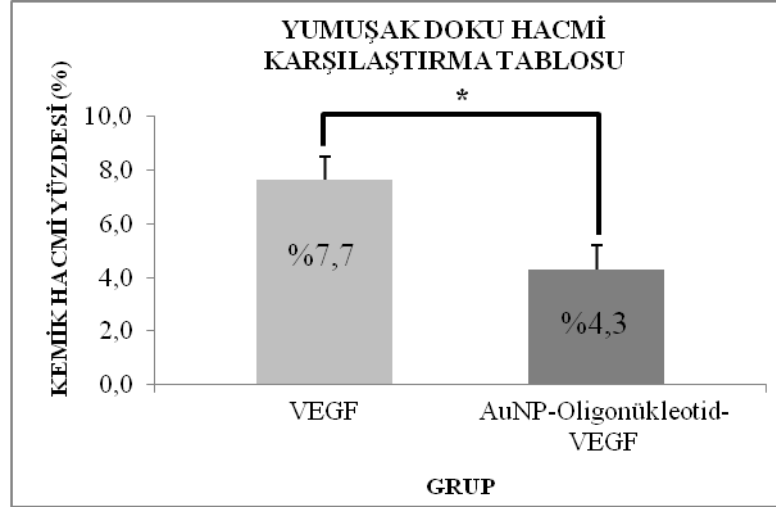
Şekil 4.34: AuNP+VEGF ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grupları arası kemik/total kemik hacminin karşılaştırması

AuNP ve VEGF grupları arasında ölçülen yumuşak doku hacmi miktarları incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen yumuşak doku hacmi miktarı AuNP grubunda gözlenen yumuşak doku hacmi miktarından daha fazladır. İstatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmıştır ($p=0,046$) ($p<0,05$) (Şekil 4.35.)



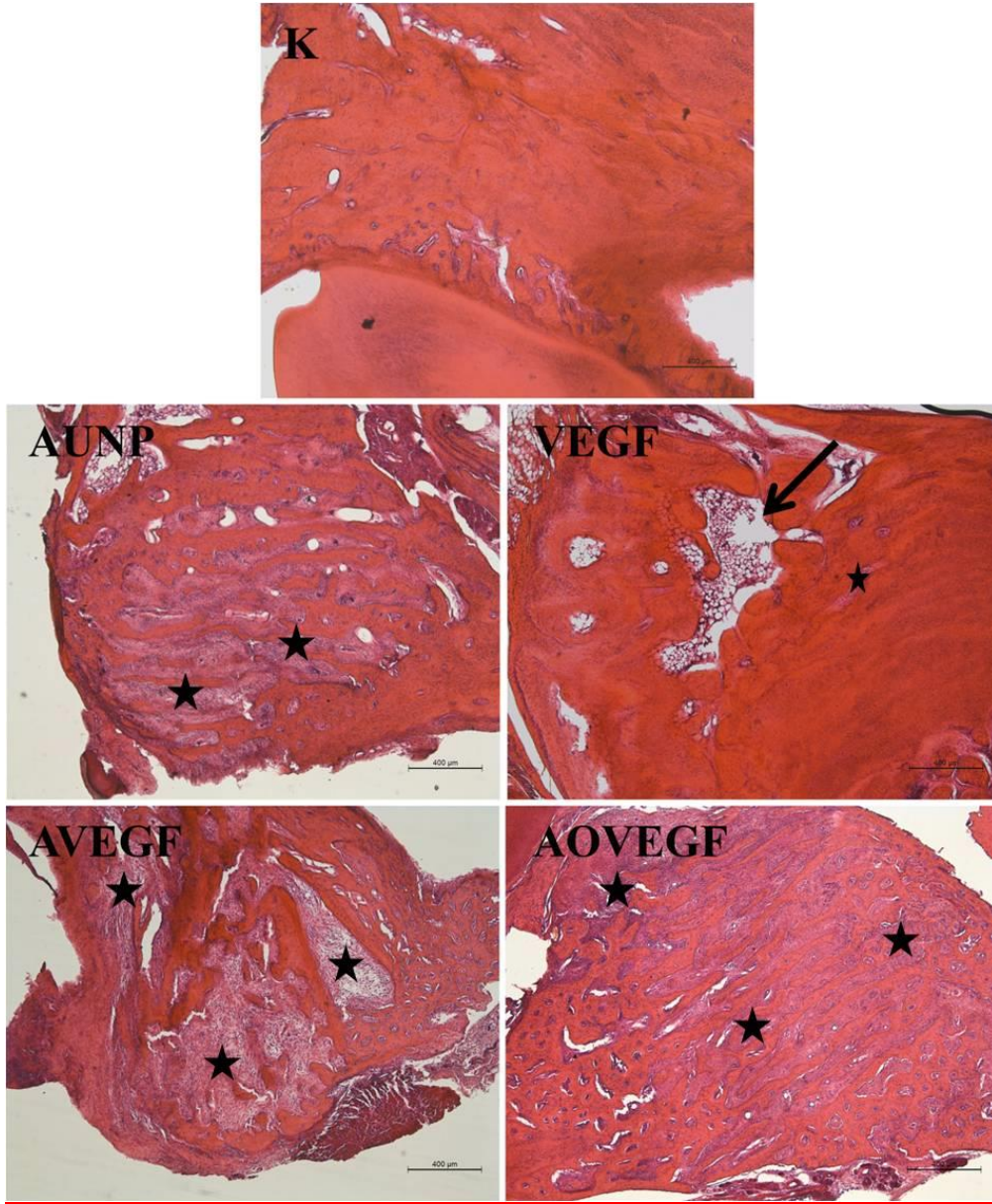
Şekil 4.35: AuNP ve VEGF grupları arası yumuşak doku hacminin karşılaştırması

VEGF ve AuNP+Oligonükleotid-VEGF grupları arasında ölçülen yumuşak doku hacmi miktarları incelendiğinde VEGF grubunda ölçülen yumuşak doku hacmi miktarı AuNP-Oligonükleotid-VEGF grubunda gözlenen yumuşak doku hacmi miktarından daha fazladır. İstatistiksel olarak incelendiğinde gruplar arası anlamlı farka rastlanmıştır ($p=0,046$) ($p<0,05$) (Şekil 4.36.)

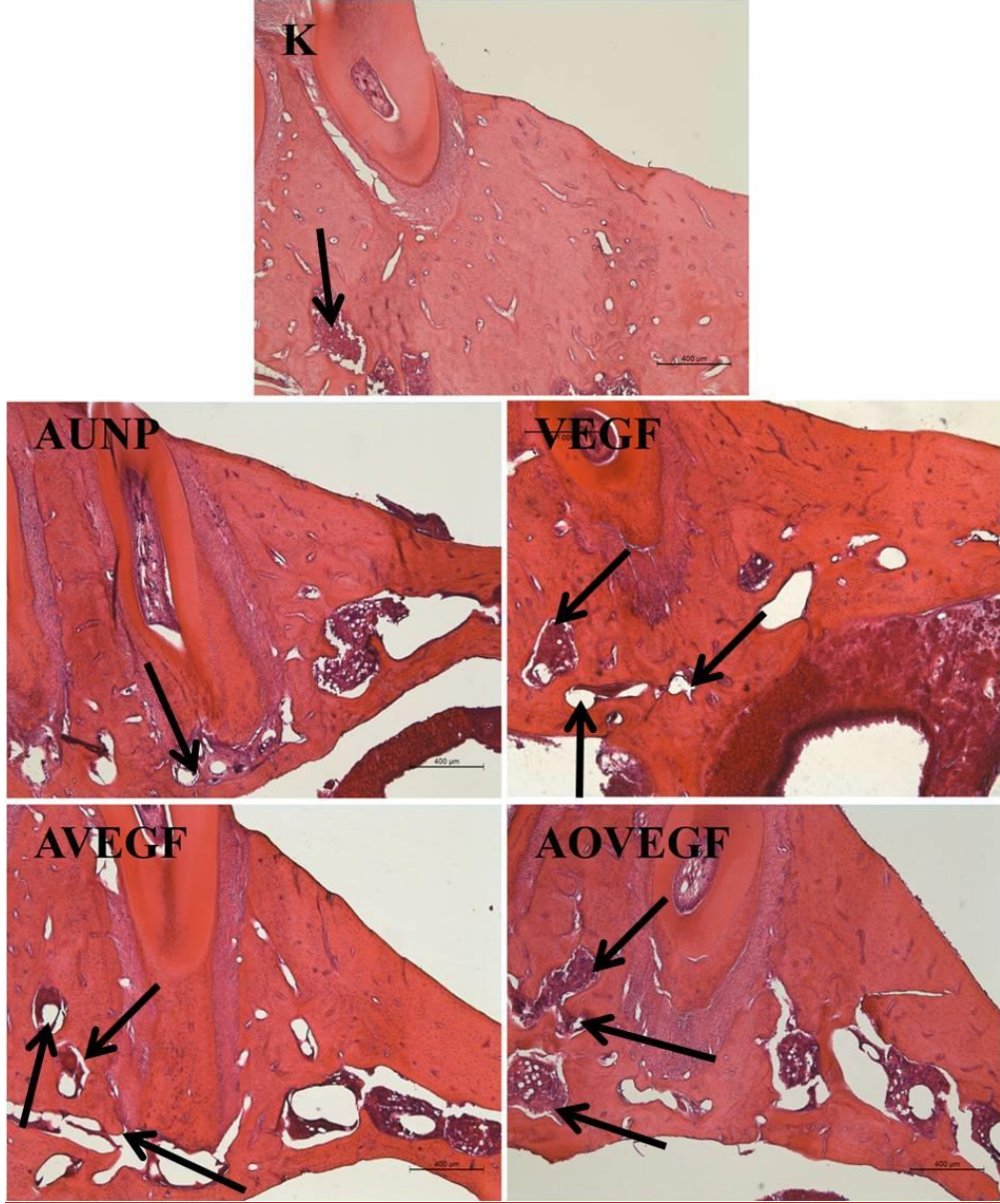


Şekil 4.36: VEGF ve AuNP+Oligonükleotid-VEGF grupları arası yumuşak doku hacmi karşılaştırması

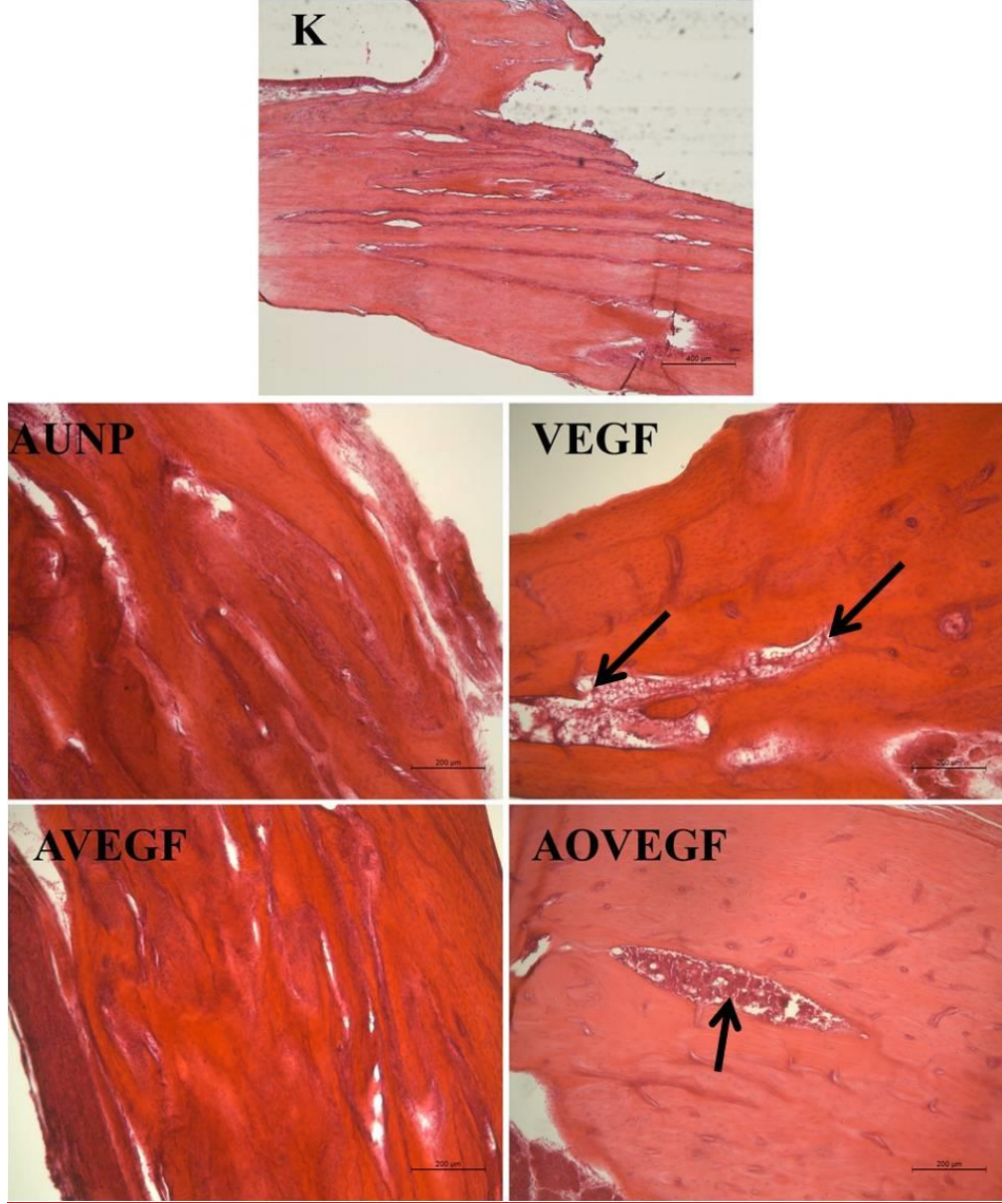
4.4. Histopatolojik Bulgular



Resim 4.1: Kesici diş bölgesinde, alveolar kemiğin, kontrol grubu ile altın nanopartikül (AUNP), VEGF, altın nanopartikül bağlanmış VEGF (AVEGF) grubu, oligo + altın nanopartikül tarafından taşınan VEGF (A0VEGF) gruplarına göre histolojik karşılaştırılması. Histolojik görüntüde kemikleşme bölgeleri (yıldız) ve damarlanma bölgeleri (ok) ile gösterilmiştir. Boyama hematoksilen eozin ile yapılmıştır. Bar: 400 µm, resimler x5'lik büyütmededir.



Resim 4.2: Molar diş bölgesinde, alveolar kemiğin, kontrol grubu ile altın nanopartikül (AUNP), VEGF, altın nanopartikül bağlanmış VEGF (AVEGF) grubu, oligo + altın nanopartikül tarafından taşınan VEGF (AOVEGF) gruplarına göre histolojik karşılaştırılması. Histolojik görüntüde damarlanma bölgeleri (ok) ile gösterilmiştir. Boyama hematoksilen eozin ile yapılmıştır. Bar: 400 µm, resimler x5'lik büyütmededir.



Resim 4.3: Palatal bölgede, alveolar kemiğin, kontrol grubu ile altın nanopartikül (AUNP), VEGF, altın nanopartikül bağlanmış VEGF (AVEGF) grubu, oligo + altın nanopartikül tarafından taşınan VEGF (A0VEGF) gruplarına göre histolojik karşılaştırılması. Histolojik görüntüde damarlanma bölgeleri (ok) ile gösterilmiştir. Boyama hematoxilen eozin ile yapılmıştır. Bar: 400 µm, resimler x5'lik büyütmededir.

4.4.1. Histopatolojik Değerlendirme

Kesitler mikroskopik olarak, kesici diş bölgesi, molar dişler bölgesi ve palatal bölge olarak 3 bölgeye ayrılarak incelenmiştir. Preparatların histopatolojik değerlendirilmesi yapılırken yeni kemik oluşumu ve yeni damar oluşumuna bakılmıştır.

Kesici diş bölgesi histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, alveolar kemikteki yeni matriks oluşumu ve kemikleşme, altın nanopartikül bağlanmış VEGF grubu ile oligo + altın nanopartikül tarafından taşınan VEGF grubunda arttığı gözlemlenmiştir. Tek başına altın nanopartikülün kemikleşme üzerine etkisi ise kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir.

Molar diş alveolar kemik bölgesi mikroskopik olarak incelendiğinde, yeni damar oluşumunda artış, altın nanopartikül bağlanmış VEGF grubu ile oligo + altın nanopartikül tarafından taşınan VEGF grubunda gözlemlenmiştir. Tek başına altın nanopartikülün damarlanma üzerine etkisi ise kontrol grubuna yakın olduğu saptanmıştır.

Palatal bölgesi histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, bu bölgedeki damarlanma, VEGF grubunda en fazla artmışken, sadece altın nanopartikül ve tek başına oligo uygulanan gruplardak ise kontrol grubuna yakın olarak gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Polianyonik oligonükleotidler ile kimyasal olarak kaplanmış altın nano parçacıklara Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü'nün (VEGF) elektrostatik olarak bağlanmasının hücresel düzeyde meydana getirdiği etki tam olarak bilinmemektedir. Literatürde bu amaçla yapılmış çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu amaçla; çalışmada polianyonik oligonükleotidler ile kimyasal olarak kaplanmış olan altın nano parçacıklara Vasküler Epitelyal Büyüme Faktörü'nün (VEGF) elektrostatik olarak bağlanması ile elde edilen kimyasal yapının, üst çenesi genişletilmiş Wistar cinsi sıçanların palatinal mukozasının altına enjeksiyonunun maksiller sutural bölgede kemikleşmeyi hızlandırıcı etkisinin olup olmadığı incelenmesi hedeflenmiştir.

Leonardi ve ark. (57), genişletme sonrası aparey ağızdan çıkarılmadan üç aylık retansiyon dönemi tavsiye etmektedir. Üç aylık pekiştirme sonrası sökülen apareyi takiben kalın ve geniş ark teli ile retansiyona devam edilir. Sutural genişleme bölgesinde yeni kemik oluşumu beklenmeden sadece dişlerden destek alan retansiyon apareyleri uygulanırsa sutural bölgenin geri kapanmasının engellenemeyeceğini bildirmişlerdir. Bu etkiler gözönünde bulundurulduğunda bu çalışmada, sıçanlara uygulanan hızlı üst çene genişletmesi sonrası yapılan AuNP-Oligonükleotid+VEGF ya da AuNP+VEGF enjeksiyonunun sıçan sutural bölgesinde kemik gelişimi hızını arttıracığı ve bu şekilde iskeletsel retansiyon ihtiyacı süresinin azaltılabileceği hedeflenmiştir.

Çalışmada damarlanmanın ve dolaylı olarak kemik gelişiminin arttırılması amacı ile VEGF kullanılmıştır. VEGF'nin, kırık yarası iyileşme bölgesine uygulanması ile ilgili bölgede damarların artacağı ve damarlar vasıtasıyla taşınan besin maddelerinin, oksijenin ve biyolojik faktörlerin yara bölgesinin iyileşme hızını arttıracığı düşünülmüştür. Bianco ve Robey (8), iskelet dokusunun bileşenlerinin progenitörleri olan kemik iliği kök hücrelerinin damarlar vasıtasıyla taşındığını; dolayısıyla osteogenezin oluşabilmesi için vaskülarizasyona ihtiyaç olduğunu ve damarlanmanın az

olması sonucu oksijen, besin ve büyüme faktörlerinin ilgili alana gerektiği kadar ulaştırılamamasına ve kemik oluşumunda yetersizliğe neden olduğunu bildirmişlerdir.

Günümüze kadar yapılmış bir çok çalışmada AuNP'ler taşıyıcı olarak kullanılmıştır (188). Yang ve ark. (207), yaptıkları çalışmada, boyutu küçük olan AuNP'lerin, hücre membranındaki porlar ve kanallar aracılığıyla hücre içine, büyük AuNP'lere göre daha kolay girdiklerini; ancak yüzey modifikasyonu yapılmamış AuNP'lerin endositoz yoluyla hücrelere alındığını bildirmişlerdir. Chithrani ve Chan (208), AuNP'lerin boyutlarının hücre içerisine alınmalarına etkisini, 14-100 nm boyutundaki AuNP'ler kullanarak incelemişlerdir ve sonuç olarak hücre içerisine endositoz yolu ile en hızlı 50 nm boyutundaki AuNP'lerin girdiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda VEGF'leri hücre içine taşıma amacıyla biyo-uyumluluğu bilinen 13 nm boyutunda AuNP kullanılmıştır. Zhang ve ark. (222), yaptıkları çalışmada AuNP'lerin hücre içine alınması ve hücre içindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda 13,5 nm boyutundaki AuNP'lerin biyo-uyumluluklarının iyi olduğunu bildirmişlerdir.

AuNP'lere bağlı VEGF'nin etkinliğini arttırabilmek için küresel AuNP'ler hazırlanmıştır. Sezgin ve ark. (232), AuNP'lerin şekillerinin hücre içine alınmalarında etkili olduğunu; örneğin çubuk şeklindeki AuNP'lerin küresel AuNP'lara göre hücre içine daha zor alındığı bildirmişlerdir. Tez çalışmamızın laboratuvar aşamasında, Turkevich ve ark.'nın (198) yöntemi kullanılarak 13nm boyutunda uniform küresel AuNP'lar elde edilmiştir. Frens (197), Turkevich ve ark. (198), Ying ve ark. (199), altın iyonlarının indirgenmesinin gerçekleştirildiği çeşitli AuNP sentez yöntemleri olduğunu ve kullanılan indirgeme ajanına göre sentezlenen AuNP'ların şekilleri, boyutları ve yüzey özelliklerinin değişmekte olduğunu bildirmişlerdir. Bizim kullandığımız yöntemde, sodyum sitratın sudaki çözeltisi kullanılarak 10-150 nm boyut aralığında uniform altın nano parçacıklar elde edilebildiğini göstermişlerdir.

VEGF'nin 13 nm boyutundaki AuNP'lerin üzerine oligonükleotidler aracılığı ile yüklenmesi ile oluşan yapının hücre içerisine alınması hücre yüzeyindeki VEGF reseptörleri ile gerçekleşmektedir. 13 nm boyutundaki AuNP üzerine 35 adet VEGF

molekölü yüklenmesi ile VEGF'nin hücre içerisine daha kolay girebileceği ve aynı zamanda, istenilen VEGF etkisinin düşük dozlarla da sağlanabileceği düşünülmüştür. Wernike ve ark (152), VEGF ve benzeri anjiyogenik büyüme faktörlerinin dokuya uygulanan biyomateryallerin kanlanmasını arttırdıklarını; ancak VEGF'nin lokal uygulamasında yüksek konsantrasyonların kullanılmasının malforme ve işlevsiz damarlanmanın gelişmesine neden olacağını rapor etmişlerdir.

Yaptığımız tez çalışmasında kullanılan AuNP'lerin yüzeyleri oligonükleotid ile modifiye edilmiş ve bu yapıya da VEGF yüklenmiştir. Bunun sonucunda AuNP'lerin elektriksel yüklerinde pozitif yönde artış olduğu Zeta-sizer cihazı ile yapılan ölçümlerde görülmüştür. Alkilany ve ark. (233), pozitif yüklü AuNP'lerin hücre içerisine negatif yüklü AuNP'lere göre daha kolay girebildiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda AuNP konsantrasyonunun, optimum konjugasyon konsantrasyonu olan 42 ng/ml olabilmesi için 0,4 mg/ml AuHCl₄ kullanılmıştır. Ortamda bulunan nano partikül konsantrasyonunun, nano partiküllerin hücre içine alınmasında pozitif yönde ilişkili olması açısından önem taşımaktadır (209). Farklı nm boyutlarda AuNP ile çalışmış olan diğer araştırmacılar farklı moleküller için farklı optimal konjugasyonları değerleri bildirmişlerdir. Sundaram ve ark (234), kontrollü ilaç salınımı yapması amacı ile 15 nm boyutundaki AuNP'leri tek sarmallı DNA (ssDNA) ile işlevselleştirmişlerdir. Her bir AuNP'ye 101±8 adet ssDNA, optimal konjugasyon değerlerinde (0,4 M NaCl ve 4 µM DNA) bağlanmıştır.

AuNP'lere VEGF yükleyebilmek amacıyla diğer bir grubumuzda da oligonükleotid ile modifiye edilmiş AuNP'lar kullanılmıştır. Rosi ve ark. (220), yaptıkları çalışmada oligonükleotid kaplı AuNP'lerin ökaryonik hücre plazma membranındaki porlardan hücre içine girebildiğini göstermişlerdir. Oligonükleotid ile modifiye edilmiş AuNP'lerin modifiye edilmemiş AuNP'lara göre nükleik asitlere afinitelerinin daha fazla olduğunu, hücre içerisinde nükleaz aktivitesinden daha az etkilendiklerini bildirmişlerdir. Oligonükleotid ile modifiye edilmiş AuNP'lerin konvensiyonel transfektan ajanlarla modifiye olmuş AuNP'lara göre daha yüksek oranda (%99) hücre içerisine girdiklerini belirtmişlerdir. AuNP+Oligonükleotid

molekölünün hücre içerisine girmesine, ortamdaki proteinlerin katkı sağladığı düşünülmektedir (211).

Yapılan hayvan deneyi çalışmasında en küçük hayvan modellerinden biri olan sıçanların maksiller sutural bölgesindeki kemik yapımı incelenmiştir. Stres altındaki sütür ve kemik değişikliklerinin histolojisi en iyi tavşan ve sıçan çalışmalarında görülmektedir (71). Benzer şekilde, başka araştırmacılar da (2, 235, 236, 237) sutural bölgedeki kemik rejenerasyon hızını inceledikleri çalışmalarında sıçan kullanmışlardır.

Sutural alandaki kemikleşme hızının sıçanların yaşlarına ve metabolizma hızlarına bağlı farklılık göstermemesi için bütün sıçanlar 14 haftalık ve benzer ağırlıklarda seçilmiştir. Kanekawa M ve Shimizu N (237), maksiller parçaların birbirinden ayrılmasıyla yeni kemik oluşumunun başladığını; ancak yaşla birlikte azaldığını bildirmişlerdir. 14 haftalık sıçanların yaşı insan yaşına uyarlandığı zaman 8 yaşındaki büyüme-gelişim dönemindeki insana denk gelmektedir. Sıçanlar sakrifiye edildikleri zaman 16 haftalık olmaktadır; bu da yaklaşık 9,5 yaşındaki insana denk gelmektedir. Sıçanların büyüme gelişim döneminde olmaları, sutural bölgelerinde aktif kemik yapım ve yıkımının olduğunu göstermektedir. Sıçanlarda genişletmenin başlaması ile sakrifikasyon arasında geçen sürenin insan yaşına kıyaslanmasında yaklaşık 1,5 insan yaşı bekleme süresi olduğu görülmektedir. Kvam (97), ve Rygh (98)'in, yaptıkları çalışmalarda sıçanlarda kök gelişimi sırasındaki doku gelişimi ve ortodontik uygulamalar sırasındaki doku yanıtı daha hızlı gerçekleşmekle birlikte, temel mekanizmaları insaninkine benzerlik göstermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda 1 sıçan yaşam gününün 30 insan gününe denk geldiği belirtilmiştir (92). Bu nedenlerle, genel olarak sıçanların, ortodontik üst çene genişletmesi sonrası sutural bölgedeki kemikleşme takibi çalışılması için iyi bir model olduğu düşünülmektedir.

Hormonal değişiklikleri en düşük seviyede tutabilmek için erkek sıçanlar tercih edilmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda da erkek sıçanlar tercih edilmiştir (2, 235, 236, 237). Genetik farklılıklardan kaynaklanabilecek etkileri en aza indirebilmek için çalışmada kullanılan sıçanların hepsi aynı cinsten seçilmiştir. Fernandes ve ark. (127), rezorpsiyon ve formasyon arasındaki dengenin birbiriyle de ilişkili olan, genetik,

mekanik, vasküler, hormonal, lokal ve beslenmeyle ilgili faktörlere bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada mekanik etki oluşturmak amacıyla aktif tek heliksli paslanmaz çelik tel, vasküler gelişimi arttırabilmek amacıyla VEGF kullanılmıştır. Sıçanların median palatal suturlarında genişleme gözlemlememize yetecek kadar kuvvet uygulayan 0,014 inç çapında, tek heliksli paslanmaz çelik teller sıçanların üst keser dişlerine açılan deliklerden geçirilerek sabitlenmişlerdir. Benzer şekilde, Jiang ve ark. (236), sıçanlarda yaptıkları çalışmada premaksiller sutur ekspansiyonunu yaklaşık 100 g kuvvet uygulayan 0,016 inç çapında paslanmaz çelik telden heliksi yaylar kullanarak yapmışlardır ve kemik rejenerasyon hızını arttırmak amacı ile de palatinal mukoza altına GSK-3 β enjeksiyonu yapmışlardır. Takahashi ve ark. (235) da RME'nin sıçanların sutural bölgesinde oluşturduğu etkileri inceledikleri çalışmada 60 g kuvvet uygulayan yayları sıçanların üst keser dişlerine uygulamışlardır. Sawada ve Shimizu (2), da RME uygulanmış sıçanların sutural bölgesinde TGF- β 'nın yeni kemik oluşumuna etkisini farklı dozlarda TGF- β kullanarak incelemişlerdir. Chang ve ark. (238), 204-209 g ağırlığında 6-8 haftalık erkek sıçanların dişlerinin arasına uyguladığı ağız içi ortodontik elastiklerle palatal ekspansiyon gerçekleştirmiş ve sutural bölgeye insan rekombinant Endotelial Hücre Büyüme Faktörü (Fibroblast Büyüme Faktörü-1, rhECGF) enjekte ederek anjiyogenik yanıtı değerlendirmişlerdir.

Yapılan tez çalışmasında elde edilen sutural genişlemeyi kaybetmemek için sıçanların dişlerine takılan heliksli genişletme teli çalışmanın sonuna kadar çıkartılmamıştır. Ortodontik tedavi sonrası nüksün daha az görülebilmesi için retansiyon aygıtlarından faydalanılmaktadır. Hicks'e göre retansiyon yapılmazsa, relaps %45 oranında, sabit retansiyonla %10-23 arası ve hareketli apareylerle %22-25 arasında olmaktadır (69). Midpalatal suturdaki sert dokuların yeniden organizasyonunun aktif genişletmenin hemen sonrasında başladığı bildirilmektedir (17, 65, 71, 140, 141). Her ne kadar sutural bağ dokusu elemanları suturun rejenerasyonunu sağlayacak şekilde proliferasyona uğrasalar da, genişletilmiş yapıları tekrar daraltıcı rezidüel kuvvetler tam olarak dağılmadan stabil bir maksiller kompleks elde edilememektedir. Çalışmada sutural genişlemenin gerçekleşmesi için 5 gün beklenmiştir; ardından AuNP, VEGF,

AuNP+VEGF, AuNP-ODN+VEGF ve Serum enjeksiyonları yapılmıştır. Enjeksiyon sonrası kemikleşmenin gerçekleşmesi için 10 gün beklenmiştir. Çalışmada sutural alanda kırık oluşturulmasından sonra toplamda 15 gün beklenmiştir, ki bu dönem sıçanlarda kırık bölgesinde kemikleşmenin en hızlı gerçekleştiği dönemdir. Li ve ark. (239), yaptıkları çalışmada 5 haftalık dönemde sıçanlarda kırık iyileşmesinin tamamlandığı gözlemlenmişlerdir. En hızlı kemik yapımının ise ilk 3 haftada olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmada elde edilen AuNP, AuNP-ODN, AuNP+ODN+VEGF kimyasal yapılarının, VEGF 165'in ve Serumun üst çenesi genişletilmiş Wistar cinsi sıçanların sutural bölgesinde neden olduğu hücresel değişiklikler 3 boyutlu hücresel sayımların ve ölçümlerin yapılabildiği modele dayalı stereoloji yöntemi kullanılarak histomorfometrik olarak incelenmiştir. İlerleyen teknoloji ile birlikte geliştirilen yeni kuşak bilgisayar programları ve mikroskoplar sayesinde yaygınlaşan stereoloji yöntemi, yapılmakta olan nitel ağırlıklı çalışmalara objektif nicel parametreler getirmiştir. Çalışmada stereoloji yöntemi, temel aldığı tarafsızlık, objektiflik ve doğruluk ilkeleriyle birlikte kantitatif ve tekrarlanabilir olması nedeni ile tercih edilmiştir. Ortodonti alanında kemik yapım-yıkımını inceleyen çalışmalarda semi-kantitatif histolojik analiz (2, 235, 236, 240) ve kantitatif modele dayalı stereolojik inceleme yöntemi, alveoler kemik hacmi değerlendirmesinde kullanılmıştır (241). Hücresel düzeyde meydana gelen değişikliklerin kantitatif incelenmesi için histomorfometri yöntemi kullanılmaktadır (242). 3 boyutlu stereoloji analizi bilgisayar ortamında oluşturulan 3 boyutlu doku modelinin, gerçek dokunun morfolojisini doğru yansıtabildiği kadar geçerlidir. Bu yöntemle ölçümlerdeki hata payı düşmekte ve 2 boyutlu histolojik incelemelerde olduğu gibi hücrelerin boyutu ve şekli ile ilgili tahminler yürütmeye gerek kalmamaktadır. Bu sebeple bu yönteme “*unbiased stereology*” de denmektedir (243). Çalışmada histolojik kesitler immüno-histo-kimyasal olarak incelenmediği için osteoblastların ve osteoprogenitörlerin proliferasyonları, farklılaşmaları ve migrasyonu ile ilgili detaylı bir bilgiye ulaşılamamıştır. Jiang ve ark. (236), yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında semi-kantitatif histolojik değerlendirme ile birlikte immüno-histo-kimyasal yöntemlerden faydalanmışlardır.

Hayvan deneyi çalışmasında, sıçanların ağırlıklarında belirgin bir düşüş görülmemiştir. AuNP, VEGF, AuNP+VEGF ve AuNP-ODN+VEGF' lerin 22 µg/mL AuNP konsantrasyonunda 24, 48 ve 72 saat osteoblast hücreleri ile muamele edilmesi ile elde edilen toksisite değerlendirmesinde data, kontrol değerlerine göre normalize edilmiştir ve bu değer %100 hücre yaşayabilirliği olarak ayarlanmıştır ve 72 saat sonunda AuNP+ODN+VEGF sitotoksitesinde bir ölçüde azalma gözlenmiştir. Toksisite bulgularımıza benzer şekilde, Zhang ve ark. (222), 13,5 nm boyutundaki küresel AuNP'lerin farelere oral, intra peritoneal ve kuyruk veni yolu ile uygulanması sonucunda kontrol grubu ile kıyaslandığında farelerin ağırlıklarında değişiklik bulmamıştır. 15. Günden sonra oral ve peritoneal uygulamada ise ağırlık düşmektedir; dolayısıyla hafif toksisite düşünülebileceğini belirtmiştir.

RME sonrası serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda sutural alanda yeni kemikleşme alanları olduğu histolojik kesitlerde görülmektedir; dolayısıyla sıçanların üst çenelerinde elde edilen transversal genişlik artışından sonra sutural bölgede gözlemlenen yeni kemikleşme alanlarının gelişmesinde, RME'nin hücrel aktiviteyi arttırmasının da etkili olabileceği düşünülmektedir. Gardner ve Kronman. (58), hayvanlarda yaptıkları histolojik çalışmada RME'nin sutural alanda ve sutural bölgedeki olgunlaşmamış kemik dokusunda hücrel aktiviteyi arttırdığını göstermişlerdir. Baydas ve ark. (59), yaptıkları sintigrafik çalışmada RME'nin maksiler, zigomatik, sfenoid, nazal kemiklerde ve midpalatal suturda metabolik aktiviteyi arttırdığını bulmuşlardır. Mekanik gerilim, osteoblastik aktiviteyi β -catenin (244) ve VEGF gibi pro-anjiyogenik faktörleri uyararak arttırmaktadır; dolayısıyla kemik oluşumunda önemli role sahiptir (136). Osteositlerin, kemik yapısının ve kütesinin korunmasından sorumlu, mekanik uyarılara hassas hücreler olduğu konusunda bir fikir birliği oluşmuştur (114, 115). Bu hücrelerin kemik dokudaki gerilime cevap verdikleri ve osteoklastları ihtiyaç alanlarına çekerek remodelingi arttırdıkları düşünülmektedir (116).

Yumuşak doku değerleri incelendiğinde tüm gruplarda uygulanan heliksli genişletme aygıtının yarattığı mekanik uyarıya bağlı olarak VEGF ve β -catenin (244) yükseldiğini düşünebiliriz. Bir çok çalışmada mekanik uyarıların lokal VEGF

seviyelerini arttırdığını belirtilmiştir (245). VEGF enjeksiyonu yapılan grubumuzda her iki etkinin (enjeksiyon+ mekanik) birleşmesi ile istatistiksel olarak diğer gruplardan çok daha yüksek anjiyogenik etki görülmüştür. AuNP içeren gruplarda ise yumuşak doku rejenerasyonunda kontrol grubundan farklı sonuçlar görülmemektedir.

VEGF grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede total hacimde artış görülmektedir. Sadece kemik hacmi incelendiğinde ise anlamlı bir artışın görülmemektedir. Çözülebilir ve heparine bağlanabilen VEGF izoformlarının (VEGF-165) birlikte uygulanmasının işlevsel damarlanma miktarını arttırdığı bildirilmiştir (150). Maes ve ark. (10), VEGF'nin, osteoblastik hücrelerin diferansiyasyonunu ve migrasyonunu etkilediğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda VEGF, osteoklastların oluşumunda, migrasyonunda, rezorptif etkilerinde ve yaşayabilmelerinde de etkilidir (181- 183). Osteoklastlar da Flt-1, Flk-1 ve Np-1 VEGF reseptörlerini üretirler (184), (182). Bu bilgileri destekleyecek şekilde, VEGF'nin, kırık bölgesinde primer insan osteoblastlarının kemotaksisini sağladığı ve hücre proliferasyonunu arttırdığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (9, 245). Mayrhoth ve ark.'nın (9), yaptıkları çalışmada insan süngerimsi kemiğinden osteoblast kültürleri 55-73 yaş arasındaki 6 donörden toplanmıştır. VEGF-A'nın primer insan osteoblastları üzerindeki kemo-atraktif ve proliferatif etkileri, insan basit fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve insan kemik morfogenezik proteini-2 (BMP-2) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bilgilere göre insan osteoblastları VEGF-A'ya tepki vermektedir ve VEGF'nin kemik oluşumunda ve gelişiminde etkisi olduğu görülmektedir. VEGF-A, hücre proliferasyonunu % 70 oranında arttırmıştır. Çalışmada elde ettiğimiz bulgular ise VEGF'nin kemik hücre proliferasyonunu %70 oranında arttırmadığını göstermektedir. Yara bölgesine enjekte edilen VEGF'nin etkisi yanında, enjeksiyonun yarattığı yaralanmaya cevap olarak gelişen dokuların biyolojik aktivitesi sonucunda da yara bölgesine VEGF salınımı gerçekleştiği düşünülmektedir. Yin-Shan (150), VEGF'nin normal ve patolojik anjiyogenezde etkileri olduğunu bildirmiştir. VEGF'nin, damarsal gelişim ve morfogenezi, damarsal tonus ve geçirgenliği, inflamatuvar ve endotelial hücrelerin kemotaksisi üzerinde etkili olduğunu vurgulamıştır. VEGF fonksiyonunun, etki ettiği hücrelere ve hücre dışı mikro-çevre koşullarına bağlı olarak dokunun ihtiyacına göre değiştiğini rapor etmiştir.

Çalışmada, AuNP içeren gruplarda görülen istatistiksel olarak anlamsız yeni kemik dokusu oluşumunu; laboratuvar ortamında hazırlanan AuNP'lerin elektriksel yüklerinin, dokuya enjekte edilmeleri ile değişmiş olabileceği ile ilişkilendirilebilir. Alkilany ve ark. (233), hücre ortamına giren AuNP'nin serum proteinlerini adsorbe etmesi ile elektriksel yüklerinin değiştiğini bildirmiştir. Verma ve ark. (246), AuNP'lerin yüzey kimyalarının, hücre içerisine alınmalarına etkisini incelemiştir. AuNP'lerin yüzey kimyalarındaki küçük değişikliklerin, AuNP'lerin yüzey elektriksel yüklerini değiştirdiği gibi hücre içerisine alınmalarında da önemli farklılıklara neden olduğunu bildirmiştir.

AuNP grubunda VEGF grubuna göre yumuşak doku hacminin ve total hacmin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıkmasında sutural bölgeye enjekte edilen AuNP'lerin sutural bölgede iyileşme dokusunda üretilen VEGF-165 ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerine bağlanarak onları inhibe etmelerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Benzer bir durumun AuNP ile VEGF'in karışımı olan deney grubunda da gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. AuNP+Oligonükleotid+VEGF grubunda ise AuNP'ler laboratuvar ortamında zaten VEGF ile bağlanmış olup elektriksel yükleri pozitif yönde artırılmıştır; bu yolla hücre içerisine geçişleri kolaylaştırılmaya çalışılmıştır. Ancak AuNP+Oligonükleotid+VEGF grubunun beklenilenden daha az etkili olmasının nedeninin hücre içerisine giren parçacıklardan VEGF'in AuNP yüzeyinden salınımının beklenenden çok daha yavaş veya mümkün olmaması olarak düşünülebilir. Mukherjee ve ark. (247), yaptıkları çalışmada heparin ile bağlanabilen VEGF-165 ve FGF gibi büyüme faktörlerinin, heparin ile bağlanmayan VEGF-121 ve endotelial büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörlerine göre AuNP'lere daha kolay bağlanabildiklerini; ancak VEGF-165 ve FGF'nin etkisini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu sebeple AuNP'lerin büyüme faktörlerinin heparin bağlanma yerlerinden bağlandıklarını düşünmektedirler. Yaptıkları çalışmada, AuNP'ler toksik bulunmamıştır.

Alveolar kemiğin histolojik yapısı yeni kemik oluşumu ve kemik yıkımı arasında karşılıklı etkileşimin olduğu süreç sonucu şekillenmektedir. Bu süreçte osteoblastlar ve osteoklastlar rol alır.

Osteoblastlar yeni matriks oluşumu ve matriksin minerallizasyonunu gerçekleştirirken osteoklastlarda bozuk yapıların uzaklaşmasını ve kemik yıkımını sağlar. Kemik yapım süreci osteoblast öncüllerinin Runx2 ile, osteoblast sayısının artışı Ki67 ile ve metabolik aktivitesinin değerlendirilmesi BMP8 ve kollajen I düzeylerinin gösterilmesiyle değerlendirilebilir.

Kemik yapım süreci yıkım süreci ile beraber görülmektedir, dolayısı ile kemik yıkım sürecinde yeni kemik yapımının baskılanması BMP3 ile, osteoklast aktivitesi nükleer faktör kappa β reseptör aktivatörü ligandı (RANKL) belirteciyle, kollajen yıkımı Cathepsin K seviyesi ile ortaya konabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda ortaya konan histolojik değişikliklerin ileride yapılacak olan yeni kemik oluşumuna osteoblastlar üzerinden etki eden faktörler ile kemik yıkımında görev alan osteoklast aktivitesini gösteren etmenlerin immunohistokimya, PCR ve *in-situ* hibridizasyon gibi hem hücresel hem de moleküler yöntemlerinin kullanılmasıyla daha açık bir şekilde ortaya konabilecek araştırmalara yön verebileceğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız çalışmanın hiçbir grubunda kemik hacminde anlamlı artış görülmemiş olmasının, uyguladığımız kimyasalların dokudaki elektrokimyasal etkileşimlerine, dağılım hızlarına, yıkımlarına, uygulama dozlarına veya enjeksiyon sayılarına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bütün bu soruların yanıtını alabilmek amacı ile çalışmanın immuno-histo-kimyasal yöntemlerle ve VEGF'nin farklı izoformları ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Deneysel üst çene genişletmesi sonrasında altın nano taşıyıcılar ile uygulanan vasküler epitelyal büyüme faktörünün sıçanların üst çene sutural bölgesinde kemik remodelingine etkisinin histomorfometrik olarak incelendiği araştırmanın sonuçları aşağıdaki gibidir:

- 1- Kemik dokusunun tüm dokulara oranı gruplar arasında farklılık göstermemektedir.
- 2- Yumuşak dokuların tüm dokulara oranı gruplar arasında farklılık göstermemektedir.
- 3- Gruplardaki kemik hacimleri gruplar arasında farklılık göstermemektedir.
- 4- Gruplardaki yumuşak doku hacimleri gruplar arasında farklılık göstermektedir.
- 5- Gruplardaki sert ve yumuşak dokuların toplamı olan total doku hacimleri gruplar arasında farklılık göstermektedir.
- 6- Sıçanların maksiller sutural bölgesindeki hızlı iskeletsel genişletme sonrası VEGF grubunda, AuNP ve AuNP+Oligonükleotid+VEGF grubuna göre, maksiller sutural bölgedeki yumuşak dokularda artış görülmektedir.
- 7- Sıçanların üst çene sutural bölgesinde hızlı iskeletsel genişletme sonrası VEGF grubunda, AuNP ve AuNP+VEGF gruplarına göre, maksiller sutural bölgedeki yumuşak ve sert dokular toplamında artış görülmektedir.

- 8- VEGF grubunun diğer gruplara göre, yumuşak dokuların tüm dokulara oranında ve kemik hacminde yarattığı etkiler incelendiğinde VEGF'nin öncelikli olarak yumuşak dokulara etki ettiği gözlenmektedir.
- 9- AuNP grubunun yumuşak ve sert dokulara etkisi incelendiğinde AuNP'nin dokular üzerinde kemikleşme aktivitesini arttırıcı bir etki oluşturmadığı gözlenmektedir.
- 10- Bu çalışmada kullanılan metod ile VEGF'nin hücre içine AuNP yardımıyla verilmesinin kemikleşme aktivitesini arttırıcı etkisi görülmemiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 111(5):525–32,1997.
2. Sawada M, Shimizu N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor beta 1 in the rat. *Eur J Orthod*, 18(2):169–79, 1996.
3. Timms DJ. Long term follow-up of cases treated by rapid maxillary expansion. *Trans Eur Orthod Soc*, 52:211–5, 1976.
4. Nicholson PT, Plint DA. A long term study of rapid maxillary expansion and bone grafting in cleft lip and palate patients. *Eur J Orthod*, 11(2):186-92, 1989.
5. Reitan F, Rygh P. Biomechanical principles and reactions. In: Graber TM, Vandarsdall RL (2nd ed.). *Orthodontics: current principles and techniques*. Mosby-Year Book, St Louis, pp 96-192, 1994.
6. Nel A, Xia T, Maldler L, Li N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311 (5761): 622-7, 2006.
7. Çulha M. *Biyoteknoloji Kitabı, Nanobiyoteknoloji Bölümü (10. Bölüm)*.
8. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*, 105(12):1663–8, 2000.
9. Mayrhoth U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Chemotactic Migration of Primary Human Osteoblasts. *Bone*, 30(3):472–7, 2002.
10. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev*, 111(1-2):61–73, 2002.
11. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics (4th ed) Chapter 6*. Mosby Elsevier, 167-233, 2007.

12. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. Contemporary Orthodontics (4th ed.). Chapter 2. Mosby Elsevier, 27-71, 2007
13. Bishara SE, Staley RN. Maxillary expansion: Clinical implications. Am J Orthod Dentofac Orthop, 91:3-14, 1987.
14. Haas AJ. Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. Angle Orthod, 31:73-91, 1961.
15. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. Contemporary Orthodontics Chapter 4. Mosby Elsevier, 107-29, 2007.
16. Björk A, Skieller V. Growth in width of the maxilla by the metallic implant method. J Plast Surg Hand Surg, 8(1-2): 26-33, 1974.
17. Melsen B. Palatal growth studied on human autopsy material. A histologic microradiographic study. Am J Orthod, 68(1):42-54, 1975.
18. da Silva Filho OG, Boas MC, Capelozza Filho L. Rapid maxillary expansion in the primary and mixed dentitions: A cephalometric evaluation. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 100(2):171-9, 1991.
19. Helm S. Malocclusion in Danish children with adolescent dentition :An epidemiologic study. Am J Orthod, 54(5):352-66, 1968.
20. Thilander B, Pena L, Infante C, Parada SS, Mayorga C. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in children and adolescents in Bogota, Colombia. An epidemiological study related to different stages of dental development. Eur J Orthod, 23(2):153-68, 2001.
21. Kutin G, Hawes RR. Posterior cross-bites in the deciduous and mixed dentitions. Am J Orthod, 56(5):491-504, 1969.
22. Hanson ML, Barnard LW, Case JL. Tongue-thrust in preschool children. II. Dental occlusal patterns. Am J Orthod, 57(1):15-22, 1970.
23. Moyers RE. Handbook of Orthodontics (4th ed). Yearbook medical publishers inc. 147-8, 1988.
24. Linder-Aronson S, Lindgren J. The skeletal and dental effects of rapid maxillary expansion. Br J Orthod, 6(1):25-9, 1979.
25. Warren DW, Hershey HG, Turvey TA, Hinton VA, Hairfield WM. The nasal airway following maxillary expansion. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 91(2):111-6, 1987.

26. Harvold EP, Chierici G, Vargervik K. Experiments on the development of dental malocclusions. *Am J Orthod*, 61(1):38-44, 1972
27. Kokich VG. Age changes in the human frontozygomatic sutur from 20 to 95 years. *Am J Orthod*, 69(4):411-30, 1976.
28. Moss ML. The differential roles of periosteal and capsular functional matrixes in orofacial growth. *Rep Congr Eur Orthod Soc*, 193-205, 1969.
29. Captier G, Lethuilier J, Oussaid M, Canovas F, Bonnel F. Neural symmetry and functional asymmetry of the mandible. *Surg Radiol Anat*, 28(4):379-86, 2006.
30. Tümen DS, Arslan SG. Çiğneme kas aktivitesi ve ölçüm yöntemleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 34(4):316-22, 2007.
31. . Melink S, Vagner MV, Hocevar-Boltezar I, Ovsenik M. Posterior crossbite in the deciduous dentition period, its relation with sucking habits, irregular orofacial functions and otolaryngological findings. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 138(1):32-40, 2010.
32. van Keulen C, Martens G, Dermaut L. Unilateral posterior crossbite and chin deviation: Is there a correlation?. *Eur J Orthod*, 26(3):283-8, 2004.
33. Thilander B, Wahlund S, Lennartsson B. The effect of early interceptive treatment in children with posterior cross-bite. *Eur J Orthod*, 6(1):25-34, 1984.
34. Chierici G, Harvold EP, Dawson WJ. Primate experiments on facial asymmetry. *J Dent Res*, 49(4):847-51, 1970.
35. Angell EC. Treatment of irregularities of the permanent or adult teeth. *Dental Cosmos*, 1: 540-544, 1860.
36. Derischweiler HR. *Die gaummennachterweiterung*. Munich: Carl Hauser Verlag. 1956.
37. Haas AJ. The treatment of maxillary deficiency by opening the midpalatal suture. *Angle Orthod*. 35:200-17, 1965.
38. Ülgen M. *Ortodontik tedavi prensipleri* . Ankara Üniversitesi Basımevi,Ankara. 1983.
39. Timms DJ. A study of basal movement with rapid maxillary expansion. *Am J Orthod.Dentofac Orthop*, 77(5):500-507, 1980.
40. Wertz RA. Changes in nasal airflow incident to rapid maxillary expansion. *Angle Orthod*, 38(1):1-11, 1968.

41. Wertz RA. Skeletal and dental changes accompanying rapid midpalatal suture opening. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 58(1):41-66, 1970.
42. Persson M, Thilander B. Palatal suture closure in man from 15 to 35 years of age. *Am J Orthod*, 72(1):42-52, 1977.
43. Biedermann W. Rapid correction of class III malocclusion by midpalatal expansion. *Am J Orthod*, 63(1):47-55, 1973.
44. Biedermann W. A hygienic appliance for rapid expansion. *JPOJ Pract Orthod*, 2(2):67-70, 1968.
45. Subtelny JD. Oral respiration: Facial maldevelopment and corrective dentofacial orthopedics. *Angle Orthod*, 50(3):147-164, 1980..
46. Timms DJ. Rapid maxillary expansion. Quintessence Co. Chicago . 1981 .
47. Howe RP. A case involving the use of an acrylic-lined bondable palatal expansion appliance. *Am J Orthod*, 82(6):464-468, 1982.
48. Arndt WV. Nickel titanium palatal expander. *J Clin Orthod*, 27(3):129-37, 1993.
49. Darendeliler MA, Strahm C, Jojo JP. Light maxillary expansion forces with the magnetic expansion device: A preliminary investigation. *Eur J Orthod*, 16(6):479-490, 1994.
50. Toroğlu S, Uzel E, Kayalıoğlu M, Uzel İ. Asymmetric maxillary expansion (AMEX) appliance for treatment of true unilateral posterior crossbite. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 122(2):164-73, 2002.
51. Iazard G. *Ortodontie* (3rd ed.). Tome VII ,120, Boulevard Saint-Germain, 120, Paris. 1950.
52. Isaacson RJ, Ingram AH. Forces produced by rapid maxillary expansion II: Forces present during treatment. *Angle Orthod*, 34(4):261-270, 1964.
53. Isaacson RJ, Murphy TD. Some effects of rapid maxillary expansion in cleft lip and palate patients. *Angle Orthod*, 34(3):143-54, 1964.
54. Bell RA. A review of maxillary expansion in relation to rate of expansion and patient's age. *Am J Orthod*, 81(1):32-7, 1982.
55. McNamara JA Jr, Brudon WL. *Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. Needham Press, Ann Arbor. 2001.
56. Sari Z, Uysal T, Usumez S, Basciftci FA. Rapid maxillary expansion. Is it better in the mixed or in the permanent dentition? *Angle Orthod*, 73(6):654-61, 2003.

57. Leonardi R, Sicurezza E, Cutrera A, Barbato E. Early post-treatment changes of circumaxillary sutures in young patients treated with rapid maxillary expansion. *Angle Orthod*, 81(1):36-41, 2011.
58. Gardner GE, Kronman JH. Cranioskeletal displacements caused by rapid palatal expansion in the rhesus monkey. *Am J Orthod*. 59(2):146-55, 1971.
59. Baydas B, Yavuz I, Uslu H, Dagsuyu IM, Ceylan I. Nonsurgical rapid maxillary expansion effects on craniofacial structures in young adult females. A bone scintigraphy study. *Angle Orthod*, 76(5):759-67, 2006.
60. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics* (4th ed) Chapter 8. Mosby Elsevier, pp 268-327, 2007.
61. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics*. (4th ed) Chapter 14. Mosby Elsevier, pp 551-76, 2007.
62. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics*. (4th ed) Chapter 13. Mosby Elsevier, pp 498-501, 2007.
63. Thorne N, Hugo A. Expansion of maxilla; spreading the midpalatal suture; measuring the widening of the apical base and nasal cavity on serial roentgenograms. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 46: 626, 1960.
64. Harberson VA, Myers DR. Midpalatal suture opening during functional posterior crossbite correction. *Am J Orthod*, 74(3):310-313, 1978.
65. Ekström C, Henrikson CO, Jensen R. Mineralization in the midpalatal suture after orthodontic expansion. *Am J Orthod*, 71(4):449-55, 1977.
66. Haas AJ. Palatal expansion: just the beginning of dentofacial orthopedics. *Am J Orthod*, 57(3):219-55, 1970.
67. Brosh T, Vardimon AD, Ergatudes C, Spiegler A, Lieberman M. Rapid palatal expansion. Part 3: Strains developed during active and retention phases. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 114(2):123-33, 1998.
68. Isaacson RJ, Zimring JF. Forces produced by rapid maxillary expansion. III: Forces present during retention. *Angle Orthod*, 35(3):178-86, 1965.
69. Hicks EP. Slow maxillary expansion. A clinical study of the skeletal versus dental response to low magnitude force. *Am J Orthod*, 73(2):121-41, 1978.
70. Bell RA, LeCompte EJ. The effects of maxillary expansion using a quad-helix appliance during deciduous and mixed dentitions. *Am J Orthod*, 79(2):152-61, 1981.

71. Storey E. Tissue response to the movement of bones. *Am J Orthod*, 64(3):229-47, 1973.
72. Korkhaus G. Present orthodontic thought in Germany. *Am J Orthod*, 46(4):270-87, 1960.
73. Chaconas SJ, Caputo AA. Observation of orthopedic force distribution produced by maxillary orthodontic appliances. *Am J Orthod*, 82(6):492-501, 1982.
74. Işeri H, Tekkaya AE, Oztan O, Bilgiç S. The biomechanical effects of rapid maxillary expansion on the craniofacial skeleton, studied by finite element method. *Eur J Orthod*, 20(4):347-56, 1998.
75. Haas AJ. Long term posttreatment evaluation of rapid palatal expansion. *Angle Orthod*, 50(3):189-217, 1980.
76. Wertz R, Dreskin M. Midpalatal suture opening: a normative study. *Am J Orthod*, 71(4):367-81, 1977.
77. Halazonetis DJ, Katsavrias E, Spyropoulos MN. Changes in cheek pressure following rapid maxillary expansion. *Eur J Orthod*, 16(4):295-300, 1994.
78. Küçükkeleş N, Ceylanoğlu C. Changes in lip, cheek and tongue pressures after rapid maxillary expansion using a diaphragm pressure transducer. *Angle Orthod*, 73(6):662-8, 2003.
79. Cameron CG, Franchi L, Baccetti T, McNamara JA Jr. Long-term effects of rapid maxillary expansion: a posteroanterior cephalometric evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 121(2):129-35, 2002.
80. Mew J. Relapse following maxillary expansion. A study of twenty-five consecutive cases. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 83(1):56-61, 1983.
81. Krebs AA. Rapid expansion of the midpalatal suture by fixed appliances. An implant study over a seven year period. *Trans Eur Orthod Soc.*, 141-2, 1964.
82. Krebs AA. Expansion of the midpalatal suture studied by means of metallic implants. *Acta Odonto Scand*, 17(4):491-501, 1959.
83. Korkhaus G. Present orthodontic thought in Germany: Jaw widening with active appliance in cases of mouth breathing. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 46(3):187-206, 1960.
84. Filho LC, De Almeida A, Ursi WJS. Rapid maxillary expansion in cleft lip and palate patients. *J Clin Orthod*, 28(1):34-9, 1994.

85. Barber AF, Sims MR. Rapid maxillary expansion and external root resorption in man: A scanning electron microscope study. *Am J Orthod*, 79(6):630-52, 1981.
86. Chang JY, McNamara JA Jr, Herberger TA. A longitudinal study of skeletal side effects induced by rapid maxillary expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 112(3):330-7, 1997.
87. Sarnas KV, Björk A, Rune B. Long-term effect of rapid maxillary expansion studied in one patient with the aid of metallic implants and roentgen stereometry. *Eur J Orthod*, 14(6):427-32, 1992.
88. Velazquez P, Benito E, Bravo LA. Rapid maxillary expansion. A study of longterm effects. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 109(4): 361-7, 1996.
89. Van Zutphen LFM. History of animal use. In: Principles of laboratory animal use (van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, Ed.) Elsevier, Amsterdam 2001, 2-5.
90. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *Angle Orthod.*, 73(1):86-92, 2003.
91. RenY, Van Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. *Eur J Ort*, 26(5):483-490, 2004.
92. Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: What is the relationship?. *Arq Bras Cir Dig*, 25(1):49-51, 2012.
93. Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod*, 41(1):1-14, 1971.
94. Romanos GE, Bernimoulin JP. Collagen as a basic element of the periodontium: immunohistochemical aspects in the human and animal gingiva and alveolar bone. *Parodontol*, 1(4):363-75, 1990.
95. Romanos GE, Schroter-Kermani C, Bernimoulin JP. Collagen as a basic element of the periodontium: immunohistochemical aspects in the human and animal. 2. Cementum and periodontal ligament. *Parodontol*, 2(1):47-59, 1991.
96. Tengku BS, Joseph BK, Harbrow D, Taverne AA, Symons AL. Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod*, 22(5):475-87, 2000.

97. Kvam E. Tissue changes incident to movement of rat molars. Thesis, Universitetsforlaget, Oslo, 1967.
98. Rygh P. Hyalinization of the PDL incident to orthodontic tooth movement. *Scand J Dent Res*, 352-357, 1972.
99. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, 61(5):577-87, 2008.
100. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11(1):47-51, 2006.
101. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*, 47:327-59, 1976.
102. Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. . En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto, pp 143-51, 2000.
103. Rizzoli R, Poser J, Bürgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism*, 35(1):71-4, 1986.
104. Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*, 128(3):1459-64, 1991.
105. Levy JR, Murray E, Manolagas S, Olefsky JM. Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology*, 119(4):1786-92, 1986.
106. Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 195(2):525-32, 1993.
107. Clément-Lacroix P, Ormandy C, Lapescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Amling M, Gaillard-Kelly M, Binart N, Baron R, Kelly PA. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology*, 140(1):96-105, 1999.
108. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*: Academic Press. California, pp 51-67, 1996.
109. Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*, 17(1):57-60, 1999.

110. Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res*, 17(11):2068–79, 2002.
111. Bonewald LF. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1116:281–290, 2007.
112. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 1092:385–96, 2006.
113. Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone*, 28(2):145–9, 2001.
114. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 57(5):344–58, 1995.
115. Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*, 33(12):1719–23, 2005.
116. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodelling. *Calcif Tissue Int*, 53(1):102–6, 1993.
117. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev*, 17(4):308–32, 1996.
118. Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10(2):86–95, 2001.
119. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthod Relat Res*, 231:239–71, 1988.
120. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, 473(2):201–9, 2008.
121. Warshawsky H, Goltzman D, Rouleau MF, Bergeron JJ. Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and adrenal tissues of the rat. *J Cell Biol*, 85(3):682–94, 1980.
122. Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akedo Y, Nakamura T, Ouchi Y, Chang C, Orimo H. Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif Tissue Int*, 54(4):325–6, 1994.

123. Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormonereceptors in human bone. *Bone*, 21(2):137-42, 1997.
124. Thomas DM, Udagawa N, Hards DK, Quinn JM, Moseley JM, FindlayDM, Best JD. Insulin receptor expressionin primary and cultured osteoclast-like cells. *Bone*, 23(3):181-6, 1998.
125. Xu LX, Kukita T, Nakano Y, Yu H, Hotokebuchi T, Kuratani T, Iijima T, Koga T. Osteoclasts in normal and adjuvant arthritis bone tissues express the mRNA for both type I and II interleukin-1receptors. *Lab Invest*, 75(5):677-87, 1996.
126. By Gary S. Firestein, Ralph C. Budd, Edward D. Harris Jr, Iain B. McInnes, Shaun Ruddy, John S. Sargent. *Textbook of Rheumatology* (8th ed). Chapter 4. Elsevier, 2009.
127. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11(2):151-7, 2006.
128. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU):2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec*, 226(4):414–22, 1990.
129. Wise GE, King GJ. Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement . *J Dent Res*, 87(5):414-34, 2008.
130. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology* . Philadelphia: W.B. Saunders Company, 985-1002, 1996.
131. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate forex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(3):686–95, 2006.
132. Bonyadi M, Waldman SD, Lui D, Aubin JE, Grynpas MD, Stanford WL. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc NatlAcad Sci USA*, 100(10):5840–5, 2003.
133. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res*, 4(1):1-6, 1982.
134. Roberts WE, Hartsfield JK Jr. Bone development and function: genetic and environmental mechanisms. *Seminars in Orthodontics*, 10:100-122, 2004.

135. Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int.*, 72(1):2-4, 2003.
136. Céline Faure, Marie-Thérèse Linossier, Luc Malaval, Marie-Hélène Lafage-Proust, Sylvie Peyroche, Laurence Vico, Alain Guignandon. Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone*, 42(6):1092–101, 2008.
137. Ganong WF. *Review of Medical Physiology* . Tercüme: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Barış Kitabevi, ss 471-487, 1996.
138. Alaqeel SM, Hinton RJ, Opperman LA. Cellular response to force application at craniofacial sutures. *Orthod Craniofac Res*, 9(3):111-22, 2006.
139. Yu JC, Lucas JH, Fryberg K, Borke JL. Extrinsic tension results in FGF-2 release, membrane permeability change, and intracellular Ca⁺⁺ increase in immature cranial sutures. *J Craniofac Surg*, 12(4):391-8, 2001.
140. Cleall JF, Bayne DI, Posen JM, Subtelny JD. Expansion of the midpalatal suture in the monkey . *Angle Orthod*, 35: 23-35, 1965.
141. Starnbach HK, Cleall JF. The effects of splitting the midpalatal suture on the surrounding structures. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 50(12):923-4, 1964.
142. Hernández-Gil IFT, Gracia MAA, Pingarrón MC, Jerez LB. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11:151-7, 2006.
143. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- β function *J. Biochem.*, 152(4):321–9, 2012.
144. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Welsh LC. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nature*, 7:359-71, 2006.
145. Smith CL, Tallquist MD. PDGF function in diverse neural crest cell populations. *Cell Adh Migr.*, 4(4): 561–6, 2010.
146. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, 284:31–53, 2003.
147. Cross MJ, Welsh LC. FGF and VEGF function in angiogenesis signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *TRENDS in Pharmacological Sciences.*, 22(4):201-7, 2001.

148. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. Fibroblast Growth Factors Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *J Tissue Eng*, 218142, 2010.
149. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801):249-57, 2000.
150. Ng YS, Krilleke D, Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res*, 10;312(5):527-37, 2006.
151. Roy H, Bhardwaj S, Hertzuala SY. Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *FEBS Lett*, 580(12):2879-87, 2006.
152. Wernike E, Montjovent M-O, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W, Klenke FM. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in-vivo. *Eur Cell Mater*, 22(19):30-40, 2010.
153. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573):435-9, 1996.
154. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573):439-42, 1996.
155. Cheng SY, Nagane M, Huang HS, Cavenee WK. Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22):12081-7, 1997.
156. Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, Syed-Ali S, Risau W. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol*, 171(2):399-414, 1995.
157. Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ, Jorcano JL. VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene*, 17(3):303-11, 1998.

158. Holmes DIR, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*, 6(2):209, 2005.
159. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*, 580(12):2879-87, 2006.
160. Scott A, Mellor H. VEGF receptor trafficking in angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 37(6): 1184-8, 2009
161. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587):983-5, 1983.
162. Horta BA, Cirino JJ, de Alencastro RB. On the structure, interactions, and dynamics of bound VEGF. *J Mol Graph Model*, 26(7):1091-103, 2008.
163. Mustonen K, Alitalo T. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J. Cell Biol.*, 129(4):895-8, 1995.
164. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(19):8915-9, 1993.
165. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*, 8(8):841-9, 2002.
166. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*, 97(3):785- 91, 2001.
167. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*, 102(4):1515-24, 2003.
168. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6):735-45, 1998.
169. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the

- cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*, 121(12):4309-18, 1995.
170. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 126(21):4895–902, 1999.
171. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*, 273(35):22272-8, 1998.
172. Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem*, 274(30):21217-22, 1999.
173. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(6):3071-6, 1999.
174. Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem*, 276(27):25520–31, 2001.
175. Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*, 275(35):26690–5, 2000.
176. Mac Gabhann F, Popel AS. Differential binding of VEGF isoforms to VEGF receptor 2 in the presence of neuropilin-1: a computational model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(6):2851–60, 2005.
177. Tampouris A.I., Kandiloros D., Giotakis I., Gakiopoulou H., Lazaris A.C The role of the VEGF-C/-D/flt-4 autocrine loop in the pathogenesis of salivary neoplasms. *Pathology–Research and Practice*, 208:151– 6, 2012.
178. Carvalho RS, Einhorn TA, Lehmann W, Edgar C, Al-Yamani A, Apazidis A, Pacicca D, Clemens TL, Gerstenfeld LC. The role of angiogenesis in a murine tibial model of distraction osteogenesis. *Bone*, 34(5)849– 61, 2004.

179. Akeno N, Czyzyk-Krzeska MF, Gross TS, Clemens TL. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia inducible factor-2alpha. *Endocrinology*, 142(2):959–62, 2001.
180. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg*, 104(3):738–47, 1999.
181. Engsig MT, Chen QJ, Thiennu H, Pedersen AC, Therkildsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaissé JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*, 151(4):879–89, 2000.
182. Nakagawaa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett*, 473(2):161–4, 2000.
183. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodamae H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med*, 190(2):293–8, 1999.
184. Harper J, Gerstenfeld LC, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression in osteogenic cells down-regulation during differentiation of osteoblasts. *J Cell Biochem*, 81(1):82–92, 2001.
185. Faure C, Linossier M, Malaval L., Lafage-Proust M, Peyroche S, Vico L, Guignandon A Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone*, 42(6):1092–101, 2008.
186. Groothuis A, Duda GN, Wilson CJ, Thompson MS, Hunter MR, Simon P, Bail HJ, van Scherpenzeel KM, Kasper G. Mechanical stimulation of the pro-angiogenic capacity of human fracture haematoma: Involvement of VEGF mechano-regulation. *Bone*, 47(2):438-44, 2010
187. Colnot CI, Helms JA. A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mech Dev*. 100(2):245-50, 2001.

188. Connor EE, Mwamuka J, Gole A. Gold nanoparticles for drug delivery. In: Chan WCW (eds). *Bio-Applications of nanoparticles*. Springer, pp 48-56, 2007.
189. Lu A-H, Salabas EL, Schüth F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization and Application. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46(8):1222-44, 2007.
190. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev*, 105(4):1103-69, 2005.
191. Sezgin E, Karataş ÖF, Çam D, Sur İ, Sayın İ, Avcı E, Keseroğlu K, Sülek S, Çulha M. Interaction of gold nanoparticles with living cells. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 26:227-46, 2008.
192. Day ES, Thompson PA, Zhang L, Lewinski NA, Ahmed N, Drezek RA, Blaney SM, West JL Nanoshell mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model. *J Neurooncol*, 104(1):55-63, 2011.
193. Kim JW, Galanzha EI, Shashkov EV, Moon HM, Zharov VP. Gold carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents. *Nat Nanotechnol*, 4(10):688-94, 2009.
194. Cai W, Gao T, Hong H, Sun Jiangtao. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl*, 1:17-32, 2008.
195. Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB. J. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *Control Release*, 149(1):65-71, 2011.
196. Huaizhi Z, Yuanta N. China's ancient gold drugs. *Gold Bull*, 34:24-9, 2001.
197. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys Sci*, 241:20-2, 1973.
198. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Faraday Soc*, 11:55-75, 1951.
199. Ying Y, Chang S-S, Lee C-L, Wang CRC. Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *J. Phys.Chem.*, 101(34): 6661-4, 1997.
200. Beesley JE. Colloidal gold for microbiological immunocytochemistry. In: Hayat MA. (eds). *Colloidal gold: Principles, methods and applications*. Academic Press, pp 421-25, 1989.
201. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, and Whyman RJ. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc Chem Commun*, 7:801-2, 1994.

202. Templeton AC, Wuelfing WP, Murray RW. Monolayer-protected cluster molecules. *Acc Chem Res*, 33(1):27-36, 1999.
203. Wang SH, Lee CW, Chiou A, Wei PK. Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J Nanobiotechnology*, 8:33, 2010.
204. Zetasizer Nano Series User Manual. MAN:0317, 2.1, U.K. Malvern Instruments Ltd, 2004.
205. Ohta S, Inasawa S, Yamaguchi Y. Real time observation and kinetic modeling of the cellular uptake and removal of silicon quantum dots. 2012, 33(18):4639-45.
206. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*, 6(4):662-8, 2006.
207. Yang J, Zeng J, Kong T, Wang X, Roa W, El-Bialy T, Xing J, Chen J. The effect of surface properties of gold nanoparticles on cellular uptake. *Life Science Systems and Applications Workshop, IEEE*, ss 92-5, 2007, Lisa
208. Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*, 7(6):1542-50, 2007.
209. Davda J, Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm*, 233(1-2): 51-9, 2002.
210. Nativo P, Prior IA, Brust M. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano*, 2(8):1639-44, 2008.
211. Giljohann DA, Seferos DS, Patel PC, Millstone JE, Rosi NL, Mirkin CA. Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-Modified gold nanoparticles. *Nano Letters*, (12):3818-21, 2007.
212. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan CW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*, 3(3):145-50, 2008.
213. Fukumori Y, Ichikawa H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv Powder Technol*, 17(1):1-28, 2006.
214. Maeda H, Seymour LW, Miyamoto Y. Conjugates of anticancer agents and polymers- advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconjug Chem*, 3(5):351-62, 1992.

215. de la Fuente JM, Berry CC. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug Chem*, 16(5):1176-80, 2005.
216. Gu YJ, Cheng J, Lin CC, Lam YW, Cheng SH, Wong WT. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 237(2):196-204, 2009.
217. Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J Am Chem Soc*, 132(5):1517-9, 2010.
218. Karataş OF, Sezgin E, Aydin O, Culha M. Interaction of gold nanoparticles with mitochondria. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 71(2):315-8, 2009.
219. Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HH, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci*, 99(7):1479-84, 2008.
220. Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AKR, Han MS, Mirkin CA. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*, 312(5776):1027-30, 2006.
221. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug Chem*. 15(4):897-900, 2004.
222. Zhang X-D, Wu H-Y, Wu D, Wang Y-Y, Chang J-H, Zhai Z-B, Meng A-M, Liu P-X, Zhang L-A, Fan F-Y. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomedicine*, 5(5):771-81, 2010.
223. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3):325-7, 2005.
224. Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, Urayama A, Vergara L, Kogan MJ, Soto C. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 393(4):649-55, 2010.
225. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnke-Dechent W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*, 3(11):1941-9, 2007.

226. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. Nanoshell-Mediated Near-Infrared Thermal Therapy of Tumors under Magnetic Resonance Guidance. *PNAS*, 100(23):13549-54, 2003.
227. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, Katayama Y, Niidome Y. PEG-Modified Gold Nanorods with a Stealth Character for in Vivo Applications. *J Control Release*, 114(3):343-7, 2006.
228. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29(12):1912-9, 2008.
229. Motoi O, Junpei N, Takehiko I, Yukio N. Smart PEGylated Gold Nanoparticles for the Cytoplasmic Delivery of siRNA to Induce Enhanced Gene Silencing. *Chem Lett*, 35(9):1046-7, 2006.
230. Cumbul A. Deneysel vazektominin farklı süreler sonrasında erişkin sıçan testisinde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin stereolojik yöntemlerle incelenmesi. Osmangazi Üniversitesi, Doktora Tezi, Eskişehir, 2008.
231. Canan, S., Şahin, B., Odacı, E., Ünal, B., Aslan, H., Bilgiç, S. ve Kaplan, S., Toplam Hacim, Hacim Yoğunluğu ve Hacim Oranlarının Hesaplanmasında Kullanılan Bir Stereolojik Yöntem: Cavalieri Prensipli, *Temel Tıp Bilimleri*
232. Sezgin E, Karataş ÖE, Çam D, Sur İ, Sayın İ, Avcı E, Keseroglu A, Sülek S, Çulha M. Interaction of gold nanoparticles with living cells. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, Sigma 26, 26:227-46, 2008.
233. Alkilany AM, Lohse SE, Murphy CJ. The Gold Standard: Gold Nanoparticle Libraries To Understand the Nano-Bio Interface. *Acc Chem Res*, Epub, 2012.
234. Sundaram P, Wower J, Byrne ME. A nanoscale drug delivery carrier using nucleic acid aptamers for extended release of therapeutic. *Nanomedicine*, 8(7):1143-51, 2012.
235. Takahashi O, Shimizu N, Iwasawa T, Hirai G. Consideration to the experimental study on the rapid palatal expansion in the rat. *Nichidai Koko Kagaku*, 15(4):473-81, 1989.
236. Jiang Y, Liu HX, Guo JJ, Tang GH, Qian YF. Stimulation of bone formation in the expanding premaxillary suture with a GSK-3 β inhibitor. *Oral Dis*, 19(1):73-9, 2013.

237. Kanekawa M, Shimizu N. Age-related changes on bone regeneration in midpalatal suture during maxillary expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 114(6):646-53, 1998.
238. Chang HN, Garetto LP, Katona TR, Potter RH, Roberts WE. Angiogenic induction and cell migration in an orthopaedically expanded maxillary suture in the rat. *Arch Oral Biol*, 41(10):985-94, 1996.
239. Li J, Ahmad T, Bergstrom J, Samnega E, Harris HE, Ahmed M, Kreicbergs A. Differential Bone Turnover in an angulated fracture model in the rat. *Calcif Tissue Int*, 75(1):50-9, 2004.
240. Kara MI, Erciyas K, Altan AB, Ozkut M, Ay S, Inan S. Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. *Arch Oral Biol*, 57(4):357-63, 2012.
241. Erdem S. Sıçanlarda deneysel diş hareketi sonrası sistemik osteoprotegerin uygulamasının retansiyon sırasında kemik remodelingine etkisinin histomorfometrik olarak değerlendirilmesi. Yeditepe Üniversitesi, Doktora Tezi, İstanbul, 2010.
242. Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone*, 7(2):119-123, 1986.
243. Peterson DA. Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. *Methods*, 18(4):493-507, 1999.
244. Case N, Ma M, Sen B, Xie Z, Gross TS, Rubin J. Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *J Biol Chem*, 283(43):29196-205, 2008.
245. Wang L, Lee W, Lei D, Liu Y, Yamashita DD, Yen SLK. Tissue responses in corticotomy and osteotomy assisted tooth movements in rats: Histology and immunostaining. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 136(6):770.e1-11, 2009.
246. Verma A, Uzun O, Hu Y, Han HS, Watson N, Chen S, Irvine DJ, Stellacci F. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*, 7(7):588-95, 2008.
247. Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res*, 11(9):3530-4, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

26 Nisan 1984 tarihinde İstanbul'da doğan İbrahim Burak Aydın, ilköğrenimini 1990-1995 yılları arasında İstanbul, Etiler Hasan Ali Yücel İlköğretim Okulu'nda, ortaokul ve lise öğrenimini 1995-2003 yılları arasında Kadıköy Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2003-2008 yılları arasında Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde diş hekimliği öğrenimini aldıktan sonra 2008 yılında Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı'nda başladığı ortodonti doktorasını 2013 yılında tamamlamıştır.