



**PERİODONTAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN
GELİŞTİRİLEN ÜÇ FAZLI PROTOTİP MEMBRANLARIN
REJENERATİF KAPASİTELERİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ**

Sühan GÜRBÜZ

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Sühan GÜRBÜZ tarafından hazırlanan “Periodontal doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilen üç fazlı prototip membranların rejeneratif kapasitelerinin in vitro olarak incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Altan DOĞAN

Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan : Prof. Dr. Gönen ÖZCAN

Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Ayşen BODUR

Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Atilla ÖZDEMİR

Periodontoloji Anabilim Dalı, GATA Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Erhan FIRATLI

Periodontoloji Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 11/05/2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

Bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sühan GÜRBÜZ
11.05.2015

PERİODONTAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ÜÇ FAZLI
PROTOTİP MEMBRANLARIN REJENERATİF KAPASİTELERİNİN İN VİTRO
OLARAK İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Sühan GÜRBÜZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2015

ÖZET

Son yıllarda gelişen periodontal doku mühendisliği yaklaşımı ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonu prensipleri birleştirilerek yeni bir prototip membran tasarlandı ve üretildi. Bu çalışmanın hedefi polikaprolakton (PCL), nano hidroksiapatit (nHA), kollajen (COL) ve rhBMP-7 içeren ve hiyerarşik olarak görev görmesi planlanan çok katlı membranın MC3T3-E1 (fare osteojenik) hücrelerinde etkisini araştırmak, nHA'nın kemik rejenerasyonuna katkısını ve rhBMP-7 yüklü membranın salım kinetiklerini ve hücre fonksiyonlarını değerlendirmektir. Membranların fiziksel özelliklerini incelemek amacıyla SEM, EDX, FTIR-ATR ve salım çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda nHA ve kollajenin yapıya katıldığı ve çok katlı membranın SEM görüntülerinde çekirdek tabakasının por genişliğinin osteoblastlar için uygun büyüklükte olduğu (337 nm) bulundu. rhBMP-7 içeren membrandaki rhBMP-7'nin %42'sini ilk 4 saat içinde, kalanının ise 3 gün boyunca salım gösterdiği bulguları. Yapılan in vitro çalışmadan elde edilen SEM görüntülerinde ise, membranın dış tabakasına hücrelerin tutunduğu, yer yer içerisine girdiği ve ekstrasellüler matriksi oluşturduğu bulguları. Tüm membranlarda hücrelerin canlı olduğu ve en çok rhBMP-7 varlığında çoğalma olduğu MTT analizi ile gözlemlendi. Hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını gösteren belirteçler ALP analizi ile, osteojenik gen sonuçları gerçek zamanlı RT-qPCR ile belirlendi. rhBMP-7'li grupta ALP aktivitesi ve COL-1, Runx2, OCN, OPN gen düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu çalışma üç farklı içerikte hazırlanmış membranlardan rhBMP-7 ile yüklenmiş PCL, nHA, COL içeren üç fazlı prototip membranın periodontal doku rejenerasyonda etkin bir membran olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu :1048

Anahtar Kelimeler : Periodontal doku mühendisliği, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, nano hidroksiapatit, kollajen, polikaprolakton, rhBMP-7, in vitro

Sayfa Adedi : 149

Danışman : Prof. Dr. Altan DOĞAN

EVALUATION OF THE REGENERATIVE CAPACITY OF TRIPHASIC PROTOTYPE
MEMBRANES CONSTRUCTED FOR THE PERIODONTAL TISSUE ENGINEERING
APPLIANCES IN VITRO

(Ph. D. Thesis)

Sühan GÜRBÜZ

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2015

ABSTRACT

A novel prototype membrane has been designed and fabricated with a graded structure (polycaprolactone- PCL, collagen- COL, nanohydroxyapatite- nHA) by combining recently emerging periodontal tissue engineering field with guided tissue regeneration principles. The purpose of thesis study is to research effect of the triphasic membranes, which are planned to serve hierarchically on MC3T3-E1 cells, to evaluate nHA for bone regeneration and to release kinetics of the membrane loaded with rhBMP-7. SEM, EDX, FTIR-ATR and release studies of the membranes which defines membranes' physical properties have been performed. As a result of these studies, it has been determined nHA and collagen joined the membrane successfully, the core layer had a suitable size for osteoblasts (337 nm). It was also discovered that 42% of rhBMP-7 was released during the first 4 hours and the remainder was released during the next three days. In SEM images, cells adhere to even at same places penetrate into the inner layer of the membrane and ECM formed. It was observed through MTT analysis that vitality of the cells within the membranes as well as greatest rate of proliferation occurred in presence of rhBMP-7. Osteoblastic differentiation markers have been determined through ALP analysis and osteogenic gene results through real time RT-qPCR. ALP activity COL-I, Runx2, OCN, OPN gene levels have been found significantly higher in BMP-7 group. In conclusion, the data we obtained in three different prototype membranes, the membrane laden with rhBMP-7 and containing PCL, nHA, COL can be an effective membrane in periodontal tissue regeneration.

Science Code : 1048

Key Word : Periodontal tissue engineering, guided tissue regeneration, nano hydroxyapatite, collagen, polycaprolactone, rhBMP-7, in vitro

Page number : 149

Supervisor : Prof. Dr. Altan DOĞAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisini benimle paylaşan, beni motive eden, doktora çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde bana yol gösteren değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Altan DOĞAN'a,

Periodontoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimimde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gönen ÖZCAN ve Sayın Prof. Dr. İ. Levent TANER'e, desteğini hep yanımda hissettiğim başta Sayın Prof. Dr. Ayşen BODUR, Sayın Prof. Dr. Berrin ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Nurdan ÖZMERİÇ KURTULUŞ olmak üzere tüm anabilim dalı öğretim üyelerine,

Periodontoloji ailesine adımımı atarken beni destekleyen ve bana beraber çalışma imkanı veren ilk danışman hocam İÜ Diş Hek. Fak. Periodontoloji AD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. H. Erhan FIRATLI'ya, tezim süresince bilgisini ve desteğini benimle paylaşan GATA Diş Hek. Bil. Mer. Periodontoloji AD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Atilla ÖZDEMİR'e, Özverili çalışmaları ile teknolojik olanaklarını ve desteklerini esirgemeyen AÜ Kimya Müh. Fak. öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ ve asistanı Emre YÜKSEL'e, HÜ Kimya Müh. Fak. öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU ve asistanı T. Tolga DEMİRTAŞ'a,

Bana tez sırasında sterilizasyon imkanlarından faydalanmamı sağlayan Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'na (TAEK), çalışma sonuçlarının istatistiksel analizinde yardımcı olan GATA İstatistik Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Selim KILIÇ'a,

Doktora eğitimim süresince tezimi gerçekleştirmemde imkan sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Programı'na bağlı Proje Birimine, aynı çalışma ortamında yer aldığım tüm Periodontoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve personeline,

Doktoram sırasında bana destek olan ve sonsuz sabır gösteren sevgili eşim Serkan GÜRBÜZ'e, gülüşü ile moral varlığı ile güç veren, neşe kaynağım canım oğlum Kemal'e, Her şartta hoşgörü, sevgi ve özverilerini esirgemeyen değerli annem Dr. Sena KARLUK'a, kıymetli babam Prof. Dr. S. Rıdvan KARLUK'a, biricik kardeşim Cihan KARLUK'a, her zaman fikirlerine değer verdiğim kıymetli anneannem Ayten DİRİMTEKİN'e ve hedeflerim doğrultusunda ilerlememi öğreten rahmetli büyükbabam Prof. Dr. Halil DİRİMTEKİN'e,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sühan GÜRBÜZ

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖZET..... | vi |
| i | |
| ABSTRACT..... | v |
| iii | |
| TEŞEKKÜR..... | ix |
| İÇİNDEKİLER..... | x |
| ÇİZELGELERİN | |
| LİSTESİ..... | xiii |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | xiv |
| RESİMLERİN LİSTESİ..... | xv |
| SİMGELER VE | |
| KISALTMALAR..... | xvii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 5 |
| 2.1. Periodontal Hastalıklar | 5 |
| 2.2. Periodontal Tedavi..... | 5 |
| 2.3. Periodontal Yara İyileşmesi Prensipleri | 6 |
| 2.4. Periodontal Rejenerasyon | 9 |
| 2.4.1. Sert doku greftleri | 10 |
| 2.4.2. Kimyasal kök yüzeyi biyomodifikasyonu | 13 |
| 2.4.3. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) | 14 |
| 2.5. Periodontal Doku Mühendisliği..... | 21 |
| 2.6. Hücre Tedavisi Yaklaşımı | 23 |
| 2.7. Doku iskeleleri..... | 29 |
| 2.7.1. Doku iskelelerinin fabrikasyonu..... | 29 |
| 2.7.2. Doku iskeleleri üretiminde kullanılan biyomalzemeler..... | 31 |
| 2.7.3. Doku iskelelerinin üretimi | 36 |
| 2.8. Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri | 40 |

| | |
|--|--------------|
| 2.9. Kemik Morfojenik Proteinler (BMP) | 42 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 49 |
| | Sayfa |
| 3.1. Prototip Membranların Üretimi | 49 |
| 3.1.1. Nanohidroksiapatit üretimi | 50 |
| 3.1.2. PCL ve PCL-nHA doku iskelesinin partikül uzaklaştırma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi..... | 51 |
| 3.1.3. PCL ve PCL-nHA membranın PCL/COL ile kaplanması..... | 52 |
| 3.1.4. PCL-nHA iskelenin PCL-COL-BMP-7 ile kaplanması | 53 |
| 3.2. Üç Tabakalı Membranın İncelenmesi..... | 54 |
| 3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji ayırt edici X ışını (Energy Dispersive by X-ray- EDX) analizi | 54 |
| 3.2.2. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared-attenuated total reflectance/FTIR-ATR)..... | 55 |
| 3.2.3. BMP-7' nin salım analizi..... | 55 |
| 3.3. Membranın Sterilizasyonu - Gamma Radyasyonu | 56 |
| 3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları..... | 56 |
| 3.4.1. MC3T3-E1 hücrelerinin ekilmesi ve çoğaltılması..... | 57 |
| 3.4.2. Hücre canlılığı testleri [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi] | 58 |
| 3.4.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi | 58 |
| 3.4.4. Alkalin fosfataz (ALP) analizi | 59 |
| 3.4.5. Hücrelerin osteojenik aktivitelerinin tayini: [Gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu-Real time quantitative reverse transcription polimerase chain reaction (RT-qPCR)]..... | 60 |
| 3.4.6. İstatistiksel analiz | 65 |
| 4. BULGULAR..... | 67 |
| 4.1. Üç Farklı Membranın Karakterizasyonu | 67 |

| | |
|---|--------------|
| 4.1.1. PCL ve PCL-nHA doku iskelelerinin karakterizasyonu..... | 67 |
| | Sayfa |
| 4.1.2. PCL-COL ve PCL-COL-BMP-7 nanofibröz membranların karakterizasyonu | 70 |
| 4.1.3. Üç tabakalı membranların karakterizasyonu | 73 |
| 4.2. rhBMP-7 Moleküllerinin Üç Tabakalı Membranlardan Kontrollü Salımının İncelenmesi | 75 |
| 4.3. Membranın In Vitro Öncesi Sterilizasyonu | 76 |
| 4.4. Hücre Kültürü Deneyleri | 76 |
| 4.4.1. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür (MTT) analiz | 76 |
| 4.4.2. Membranlar üzerinde hücre tutunma özelliğinin SEM ile analizi..... | 78 |
| 4.4.3. ALP analizi | 86 |
| 4.5. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonları (RT-PCR) Analizleri | 87 |
| 5. TARTIŞMA..... | 91 |
| 6. SONUÇLAR..... | 109 |
| KAYNAKLAR..... | 111 |
| EKLER..... | 145 |
| EK-1.Işınlama Sertifikası..... | 147 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 149 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. Kemik greft materyallerinin osteojenik özelliklerine göre sınıflandırılması[104]..... | 11 |
| Çizelge 2.2. Kemik greftlerinin sınıflandırılması [1, 16, 107]..... | 12 |
| Çizelge 2.3. Ticari olarak bulunan membranlar ve özellikleri [16, 135, 142]..... | 18 |
| Çizelge 2.4. Kemik morfojenik proteinlerin bulunduğu yerler ve fonksiyonları | 43 |
| Çizelge 3.1. CaPTris Yöntemi | 51 |
| Çizelge 3.2. Sterilizasyon koşulları | 56 |
| Çizelge 3.3. Karışımın hazırlanması | 62 |
| Çizelge 3.4. Hazırlanan karışımın c-DNA haline getirilmesi | 62 |
| Çizelge 3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri | 63 |
| Çizelge 3.6. qPCR'ın son aşaması için hazırlanan örneklerin dağılımı..... | 64 |
| Çizelge 4.1. Membranın içerisindeki elementlerin ağırlıkları | 70 |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları [89] | 7 |
| Şekil 2.2. a. Periodontitis: Ataşman kaybı ve kemik rezorpsiyonu b. Uzun birleşim epiteli ile iyileşme c. Periodontal rejenerasyon: Kök yüzeyine yeni epitel ve bağ dokunun bağlanması..... | 9 |
| Şekil 2.3 Periodontolojide tanımlanan doku mühendisliği [98] | 23 |
| Şekil 2.4. Hücre tedavisi yaklaşımı..... | 24 |
| Şekil 2.5. Elektro-eğirme deney düzeneği | 38 |
| Şekil 2.6. Çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma tekniği | 39 |
| Şekil 2.7. Büyüme faktörlerinin etki mekanizmaları [230] | 41 |
| Şekil 3.1. Membran gruplarının kısaltmalar ile gösterilmesi..... | 49 |
| Şekil 3.2. Real time qRT-PCR'ın aşamaları | 60 |
| Şekil 3.3. PCR'nin Light Cyclers Nano cihazında yürütülen programı | 65 |
| Şekil 4.1. nHA partiküllerinin yapıya katılımının gösterilmesi | 69 |
| Şekil 4.2. PCL ve PCL/COL membranlara ait FTIR-ATR spektrumu..... | 72 |
| Şekil 4.3. Üç tabakalı membranlardan BMP-7 salımının incelenmesi | 76 |
| Şekil 4.4. İstatistiksel olarak n=3, kontrol grubu PCL/PCL-COL iken * p<0,05; *** p<0,001 kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken • p<0,05 , ●● p<0,01, ●●● p<0,001..... | 77 |
| Şekil 4.5. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL: PCL-COL iken, * p<0,05;*** iken p<0,001; kontrol grubu PCL-nHA: PCL-COL iken • p<0,05; ●●● iken p<0,001..... | 86 |
| Şekil 4.6. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/PCL-COL iken, * p<0,05; ** iken p<0,01;*** iken p<0,001; kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken • p<0,05; ●● iken p<0,01..... | 87 |
| Şekil 4.7. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/PCL-COL iken, * p<0,05 ; ** P<0,01, kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken • p<0,05..... | 88 |
| Şekil 4.8. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/ PCL-COL iken, ** p<0,01; kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken ●● p<0,01..... | 89 |
| Şekil 4.9. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/PCL-COL iken, ** p<0,01; kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken ●● p<0,01..... | 90 |

RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|---|--------------|
| Resim 2-1 Çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma yöntemi üretilen PLGA doku iskelelerine ait örnek SEM görüntüleri [228]..... | 39 |
| Resim 3-1. 2 mm' lik teflon kalıplar..... | 51 |
| Resim 3-2. A: PCL-nHA iskele. B: PCL-COL ile kaplanmış PCL-nHA iskele..... | 52 |
| Resim 3-3. a. Elektro-eğirme düzeneği b. Şırınga yardımıyla PCL-COL çözeltinin elektro-eğirme düzeneğinde doku iskelelerine toplanması c. Enjektör (dozaj) pompasının değerlerinin ayarlanması | 53 |
| Resim 3-4. Tıbbi sterilizasyon amacıyla paketlenen membranlar ve Gamma Radyasyon Odası (TAEK) | 56 |
| Resim 3-5. Laminer akış kabini içinde membranların kültür ortamına hazırlanması..... | 58 |
| Resim 3-6. Membranların altın paladyum ile kaplandıktan sonra görüntülenmek üzere SEM için hazırlanması | 59 |
| Resim 4-1. PCL iskelenin SEM görüntüsünün hesaplanması: 200X. | 68 |
| Resim 4-2. PCL doku iskelelerinin farklı büyütme oranlarında çekilen SEM görüntüleri: (a) 1000X, (b) 2000X. | 68 |
| Resim 4-3. PCL-nHA iskele görünümü: (a) 500X, nHA'lar iskelenin içinde görüntülenmektedir: (b) 2000X..... | 69 |
| Resim 4-4. PCL-COL elektro-eğirme yapılmış farklı büyütme oranlarındaki membran görüntüleri: (a) 1000X, (b) 5000X, (c) 10 000X, (d) 10 000X. | 71 |
| Resim 4-5. PCL-COL-BMP-7 membranlara ait SEM görüntüleri: (a) 1000X, (b) 5000X, (c) 10 000X, (d) 10 000X. | 73 |
| Resim 4-6. PCL-COL kaplı PCL-nHA membranın enine kesit görüntüleri: (a) 200X, (b) 500X. | 74 |
| Resim 4-7. PCL-COL-BMP-7 kaplı PCL-nHA membranın yüzey kesit görüntüleri: (a) 1000X, (b) 5000X..... | 74 |
| Resim 4-8. Tek tarafı PCL-COL-BMP-7 kaplı diğer tarafı PCL-COL kaplı PCL-nHA membran görüntüleri: (a) 200X, (b) 400X. | 75 |
| Resim 4-9. PCL/PCL-COL membran görünüşleri: (a) 4.gün, 100X; (b) 4. gün, 2500X; (c) 4. gün, 5000X; (d) 4. gün, 10 000X; (e) 7. gün, 1000X; (f) 7. gün, 5000X; (g) 14. gün, 500X; (h) 14. gün, 10 000X. | 79 |

| Resim | Sayfa |
|--|--------------|
| Resim 4-10. PCL-nHA/PCL-COL membran görünümleri: (a) 4.gün, 500X; (b) 4. gün, 2500X; (c) 4. gün, 5000X; (d) 4. gün, 20 000X; (e) 7. gün, 500X; (f) 7. gün, 2500X..... | 81 |
| Resim 4-11. PCL-nHA/PCL-COL membran görünümleri: (a) 7.gün, 20 000X; (b) 7. gün, 40 000X; (c) 14. gün, 500X;(d) 14. gün, 5000X; (e) 14. gün, 20 000X; (f) 14. gün, 40 000X..... | 82 |
| Resim 4-12. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membran görünümleri: (a) 4.gün, 496X; (b) 4. gün, 5000X; (c) 4. gün, 10000X; (d)4. gün, 40 000X; (e) 7. gün, 500X; (f) 7. gün, 5000X..... | 84 |
| Resim 4-13. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membran görünümleri: (a) 7.gün, 5000X; (b) 7. gün, 10 000X; (c) 14. gün, 500X; (d) 14. gün, 5000X; (e) 14. gün, 10 000X; (f) 14. gün, 40 000X..... | 85 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklamalar |
|--------------------|---|
| °C | santigrat derece |
| Kısaltmalar | Açıklamalar |
| ALP | Alkalin fosfataz |
| BMP | Kemik morfojenik protein |
| BMSC | Kemik iliği kaynaklı kök hücreler |
| BSP | Kemik sialoprotein |
| COL | Kollajen |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| DCM | Diklorometan |
| DDKA | Deminerale dondurulmuş kurutulmuş allogreft |
| DEX | Deksametazon |
| dk | Dakika |
| DKA | Dondurulmuş kurutulmuş allogreft |
| dNTP | Deoksiriboz nükleozit trifosfat |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| d-PTFE | Yüksek yoğunluklu politetrafloroetilen |
| ECM | Ekstrasellüler matriks |
| EDAX | X-ray analizi ile enerji dağıtıcı |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| EMD | Mine matriks proteinleri |
| e-PTFE | Genişletilmiş politetrafloroetilen |
| FBS | Fetal sığır serumu |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| FITC | Floresan izotiosiyanat |
| FTIR-ATR | Fourier transform infrared attenuated total reflectance |
| g | gravity |
| g/mol | gram/mol |
| GPa | Gigapascal |

Kısaltmalar**Açıklamalar**

| | |
|--------------|---|
| HFIP | 1,1,1,3,3,3-Hexa fluoro-2-propanol |
| kD | Kilodalton |
| kGy | Kilogray |
| M | Molar |
| MC3T3-E1 | Fare kalvarya pre-osteoblast hücre hattı |
| MET | Metronidazol |
| MKH | Mezenkimal kök hücreler |
| mL | Mililitre |
| MTT | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| nHA | Nano hidroksiapatit |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| OCN | Ostaokalsin |
| OPN | Osteopontin |
| PCL | Polikaprolakton |
| PBS | Fosfat tampon çözeltisi |
| PDGF | Trombosit kaynaklı büyüme faktörü |
| PGA | Poliglikolik asit |
| pH | Power of hydrogen |
| PLA | Polilaktik asit |
| PLGA | Polilaktik-ko-glikolik asit |
| PMNL | Polimorfonükleer lökositler |
| PIPAAm | Poli(N-izopropil akrilamid) |
| RNA | Ribonükleik asit |
| rpm | Revolution per minute |
| RT-qPCR | Reverse transkriptaz kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu |
| Runx2 | Runt-related transcription factor 2 |
| s | Saniye |
| sa | Saat |
| SAOS-2 | İnsan sarkoma hücre hattı |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| TGF- β | Dönüştürücü büyüme faktörü- β |
| Tris | Hidroksimetil aminometan |

Kısaltmalar**Açıklamalar**

UMR-106

Sıçan osteosarkom hücre hattı

v/v

hacim/hacim

w/v

ağırlık/hacim

w/w

ağırlık/ağırlık

 μL

Mikrolitre

 μm

Mikrometre

 α -MEM

Minimum essential medium alpha modification

 β -TCP β - trikalsiyum fosfat

1. GİRİŞ

Periodonsiyum dişin destek yapıları olan dişeti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinden meydana gelir. Periodonsiyumu oluşturan her bir eleman anatomik lokasyon, mimari yapı, biyokimyasal ve hücrel içerik bakımından birbirinden farklı özelliklerde olsa da bu yapılar fonksiyon olarak bir bütün halinde görev görür [1, 2].

Diş ve dişeti kenarında biriken mikrobiyal dental plağın uzun süreli retansiyonu periodontal dokularda yıkıma neden olur. Plağa bağlı patolojik değişiklikler önce dişetinde şişlik, kızarıklık ve kanama şeklinde kendini gösterir. Gingivitis adı verilen bu aşamada henüz ataşman kaybı oluşmamıştır. Periodontitis ise bağ doku ataşmanı ve alveol kemiği kaybıyla karakterizedir. Başlangıçta sadece dişetini etkileyen patolojik değişiklikler hastalığın ilerlemesiyle bağ doku ataşmanının parçalanması ve kemik yıkımı ile dişin kaybına yol açar [3].

Periodontal hastalıkların tedavisi esas etyolojik faktör olan mikrobiyal dental plağın diş ve dişeti dokularından uzaklaştırılmasıyla yapılır. Periodontitisin ağız bakım uygulamalarıyla başlayan tedavi süreci, diştışı temizliği, kök yüzeyi düzleştirilmesi ve bu tedavilerin sonucunda derin ceplerin varlığı halinde cerrahi uygulamalarla devam eder.

Bu geleneksel tedavi uygulamaları patojenik mikrofloranın eliminasyonunu sağlarken, iyileşme sonrasında anatomik yapı bozuklukları ve azalmış bir periodonsiyumu da birlikte getirir. Periodontal sağlığın yeniden kazanılması için patojenik mikrofloranın uzaklaştırılması yanında periodonsiyumun yapı ve fonksiyon bakımından hastalık öncesi durumuna gelecek şekilde rejenerasyonunun sağlanması gerekir. Bu durum diş desteğinin artırılması ve plak eliminasyonunun kolaylıkla yapılabileceği fizyolojik dişeti konturlarının elde edilmesi bakımından önemlidir [4].

Melcher (1976) periodonsiyumu oluşturan dokuların birbirinden farklı iyileşme potansiyeline sahip olduğunu ve bu süreçte yara bölgesine gelecek hücre tiplerinin oluşacak iyileşmenin şeklini belirleyeceğini bildirmiştir [5].

İyileşme sürecinde kök yüzeyine öncelikli olarak periodontal ligamentten gelen mezenkim hücrelerin tutunmasıyla yeni sement ve içinde sonlanan bağ doku liflerinden oluşan bir doku

iyileşmesi meydana gelir. Bu tip iyileşmeye yeni ataşman adı verilir [6-8]. Yeni ataşman ile osteojenik hücrelerin yara bölgesinde alveol kemiğini oluşturmasıyla periodontal rejenerasyon meydana gelir [9].

Bu bilgiler doğrultusunda geliştirilen yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) tekniği, periodontal hastalık nedeniyle kaybedilen dokuların rejeneratif tedavisinde kullanılmaktadır [7, 8, 10]. Bu teknikte, dişeti ve kök yüzeyi arasına yerleştirilen bariyer membran yardımıyla epitel ve dişeti bağ dokusu hücreleri kök yüzeyinden uzak tutulurken, bu bölgede öncelikle periodontal ligament hücrelerinin re-popüle olması hedeflenir. Bariyer membranların bir diğer görevi ise defekt bölgesinde rejeneratif dokuların yerleşeceği bir boşluk yaratarak yara bölgesinde pıhtı stabilizasyonunu sağlamaktır [11]. Tonetti ve diğerlerinin kemik içi defektlerde yaptıkları çalışmada, periodontal rejenerasyonu etkileyen faktörün periodontal defektin derinliğinden çok, membranın altında kalan boşluğun miktarı diğer bir deyişle bölgede oluşan pıhtının olduğunu bildirmişlerdir [12].

Bariyer membranların periodontal dokuların rejenerasyonunda kullanılması sonrasında oluşan iyileşmenin klinik olarak kişiden kişiye değişkenlik gösterdiği saptanmıştır [13]. İyileşmedeki bu farklılıkların ağız bakım alışkanlıkları, sigara kullanımı, diyabet gibi hastaya bağlı genel faktörler, membranın erken rezorpsiyonu veya ağız ortamına açılması, dişin mobilitesi, kemik defektinin morfolojisi ve büyüklüğü gibi hastaya bağlı lokal faktörler, hekime bağlı cerrahi hatalar ve oklüzal kuvvetlerin yanlış iletimi gibi durumlardan etkilendiği gösterilmiştir [14-19].

Periodontal dokuların iyileşme potansiyeline etki eden durumları elimine etmek amacıyla farklı yöntemler ve ajanlar araştırılmaktadır. Cerrahi sırasında uygulanan modifiye flep tasarımları ve mikrocerrahi teknikleri, bariyer membranların kemik greftleri, büyüme faktörleri veya gen tedavileri ile beraber kullanımı, membran yapısına antimikrobiyal veya antiinflamatuvar ajanların eklenmesi gibi yöntemlerin iyileşme potansiyeline etkileri araştırılmaya devam edilmektedir [16, 20-27].

Biyomühendislik ve nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda hücrelerin içerisine yerleşip çoğalabileceği, doğal ve sentetik materyallerin bir araya getirilerek üretildiği nanofibröz iskeleler rejeneratif tıpta yer almaya başlamıştır. Üç boyutlu olarak tasarlanan poröz iskeleler, deri [28], kemik [29-33], kıkırdak [34, 35], östaki borusu [36], kalp [37],

iskelet-kas [38], karaciğer [39], kornea [40], mesane [41], retina [42], damar [43] ve sinir [44] dokularının fabrikasyonunda kullanılmak üzere üretilmektedir. Langer ve Vacanti (1993) biyosinyal moleküller ve doku iskeleleri aracılığıyla hücrelerin ağız dışında fabrikasyonunu sağlayacak tekniklerin geliştirilmesini içeren “doku mühendisliği” kavramını ortaya koymuşlardır [45].

Periodontoloji alanında doku mühendisliği prensipleriyle çeşitli büyüme faktörleri içeren kemik morfojenik proteinler (BMP-2, BMP-7) [46-48], mine matriks proteinleri (EMD) [49], trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB) [50] ve P-15 peptitleri [51] gibi biyomateryallerin üretimi ve ticari olarak kullanıma geçilmesine rağmen henüz tam bir rejenerasyonun oluşmasını sağlayacak yöntem ya da materyal üretilmediği için bu konuda araştırmalar devam etmektedir [19, 48, 50, 52-59].

Periodontal rejenerasyon amacıyla en güncel yaklaşımlardan biri, bölgeye sadece hücre ve/veya büyüme faktörlerinin uygulanması değil, aynı zamanda biyofiziksel olarak yara iyileşmesini yönlendirmek ve hücrelerarası etkileşimi sağlamak üzere farklı katmanlardan oluşan dokudaki ekstrasellüler matrikse (ECM) benzer taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır [1, 60-62]. Bu nedenle, periodontal tedaviye yönelik tasarıma sahip üç fazlı iskelelerin YDR’de kullanımı için in vitro araştırmalar başlamıştır [52].

Periodontal rejenerasyon sağlanmasında diğer bir yaklaşım da hücre tedavisidir. Hücre tedavisi araştırmalarında, periodontal ligamentten kaynağını alan hücrelerin periodontal defektlerin içinde açığa çıkmış dentin yüzeylerinin üzerinde sınırlı düzeyde sement oluşturduğu gösterilmektedir [63, 64]. Bunun yanında yapılan çalışmalarda kök yüzeyine bağ dokunun adaptasyonu ve yeni kemik rejenerasyonun sağlandığı bulgulanmıştır [64-67]. Ancak tekniğin dezavantajı olarak hücre transplantasyonu sırasında dokuda immünolojik ya da iltihabi reaksiyon oluşturma riskinden dolayı çalışmalar doku mühendisliğinin diğer alanlarında yoğunlaşmaktadır [68].

Bu tez çalışmasında, periodontal rejenerasyonun gereksinimlerini karşılamak üzere epitel ve bağ dokunun bölgeye ilerlemesini engelleyen, osteogenez ve sementogenezi indükleyen, uzun süre degrade olmayan, kolay uygulanabilir olması gibi özelliklerin bir arada bulunduğu bir “prototip membran” in üretilmesi hedeflendi.

Üç tabakadan oluşan bu prototip membranın her bir tabakası farklı görevleri farklı iyileşme fazlarında gerçekleştirmek için tasarlandı. Osteoblast hücrelerinin membranın içerisine nüfuz etmesi için boşluk sağlayan ve membranın fiziksel desteğini karşılayan orta tabaka olan “iskele” yapısı, polikaprolaktondan (PCL) üretildi. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda PCL bazlı doku iskelelerinin hücrelerdeki biyouyumluluğu, çoğalması ve mineralizasyon oluşturma kapasiteleri incelenmiş ve PCL'nin periodontal rejenerasyonda etkinliği gösterilmiştir [32, 52, 53, 69-73]. Membranın kemik oluşumunu sağlayacak tabaka olan iskeleye PCL'nin polimer yapısının biyouyumluluğunu artırmak ve kemik oluşumuna destek vermek için alveol kemiğin inorganik matriksinde de bulunan nano hidroksiapatit (nHA) eklendi.

Dişeti epiteli ve bağ dokusu hücrelerinin kök yüzeylerine erken dönemde gelmesini engellemek amacıyla bariyer görevi görecektir olan “dış tabaka” PCL ve kollajen (COL) ile oluşturuldu. Doku iskelesinin bağ doku atışmanı ile uyumu, doku bütünlüğünün sağlanması ve yara iyileşmesindeki rolü nedeniyle dişetin organik matriksinde de bulunan kollajen kullanıldı [74].

Periodontal atışman oluşumunun hızlandırılması ve sementogenezin indüklenmesini hedefleyen “iç tabaka” ise, dış tabaka ile aynı materyallerden üretilerek içerisine kemik morfojenik protein-7 (BMP-7) eklendi.

Çalışmamızda periodontal rejenerasyon için ürettiğimiz farklı içeriklere sahip üç fazlı olarak üretilmiş üç farklı prototip membranın fiziksel özelliklerini, içinde bulunan BMP-7 salımını ve membranların biyouyumluluğunu; in vitro olarak osteojenik hücrelerin membrana tutunması, çoğalması ve ekstrasellüler matriks üretimini inceleyerek değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalıklar; diş ve dişeti kenarında biriken mikrobiyal dental plak ile içindeki patojen mikroorganizmaların periodonsiyumda oluşturduğu kronik iltihabi hastalıklardır [75]. Periodontal hastalıklar iki ana başlık altında incelenebilir. Bunlardan gingivitis, dişetin iltihabi ve enfeksiyöz bir hastalığı olup klinik olarak dişeti kenarında kızarıklık, ödem ve kanama ile karakterizedir. Periodontitis ise dişetinden başlayarak dişin tüm destek dokularına yayılan, periodontal ataşman kaybı ve alveol kemiği rezorpsiyonuyla karakterize bir hastalıktır [76].

2.2. Periodontal Tedavi

Periodontal tedavide amaç; dişetinde iltihabi değişikliklere neden olan mikroorganizmaları yok etmek, periodontal cebi azaltmak, yumuşak doku ve kemik yıkımını durdurmak, sağlıklı fizyolojik dişeti konturunu oluşturmak ve bu şekilde hastalığın nüksünü önleyerek diş kaybına engel olmaktır [77, 78].

Plak ve retantif sahaların kaldırılması, diştaşı temizliği, kök yüzeyi düzleştirilmesi, etkin plak kontrolü ve oral hijyenin sağlanması “Faz 1 tedavi” olarak adlandırılan günümüzün standart tedavi yaklaşımıdır [79]. Gingivitis ve hafif şiddetteki kronik periodontitiste Faz 1 tedavi uygulamaları yeterli olmaktadır. 5-7 mm ve üzeri derin ceplerin bulunduğu ileri vakalarda, özellikle de kemik içi ve furkasyon defektlerinde periodontal cerrahi uygulamalarına ihtiyaç duyulur [80]. Agresif ve atipik periodontitislerde ise geleneksel uygulamalara ek olarak sistemik antimikrobiyal ajanların kullanılmasının, patojenik mikrofloranın baskılanması ve hastalığın nüksünün engellenmesi için gerekli olduğu belirtilmiştir [3, 81, 82]. Periodontal tedavi sonrasında periodontal sağlığın uzun süre korunması için idame tedavisine ihtiyaç vardır. Hastanın 3-6 ayda bir kontrole çağrılarak diş ve dişetindeki hastalıkların erken dönemde tedavi edilmesiyle uzun süreli sağlığın korunması mümkün olabilmektedir[83].

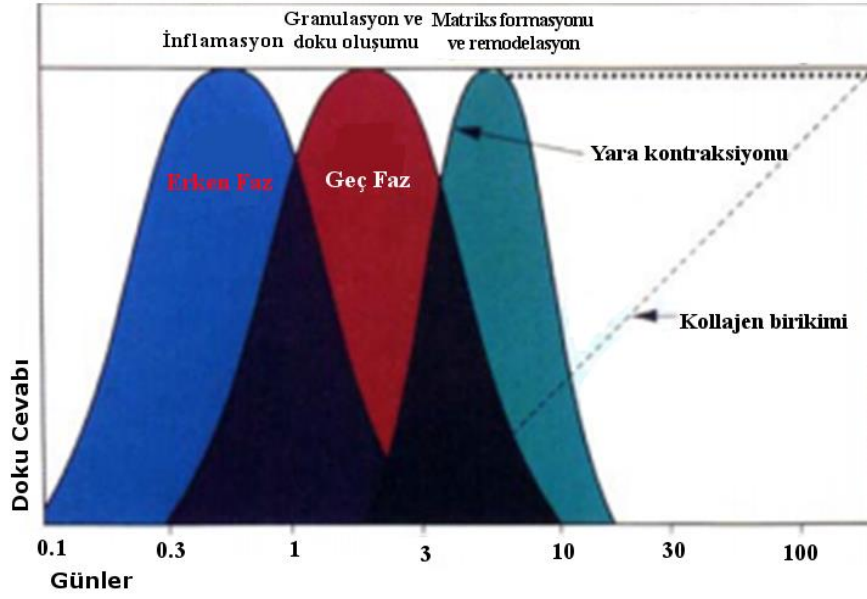
Periodontal cerrahide hedef, mikrobiyal dental plağın kök yüzeylerinden direk görüş sağlanarak uzaklaştırılması, periodontal cebin ortadan kaldırılması ya da derinliğinin

azaltılması, dişeti ve kemik konturlarının oral hijyene ve periodontal devamlılığı sağlayacak şekilde yeniden düzenlenmesidir. Rezektif işlemler olarak da adlandırılan gingivektomi, gingivoplasti ve flep operasyonları ile beraber uygulanan osteoktomi ve osteoplasti işlemleri [84], plak eliminasyonu ve fizyolojik dişeti konturlarına ulaşmada etkili olurken, kök yüzeyinin açığa çıkmasıyla kök çürüğü riski, dişte hassasiyete neden olması, fonetik sorunlar nedeniyle artık günümüzde kullanımı kısıtlı kalmıştır [85, 86]. Bu nedenlerden dolayı günümüzde rejeneratif tekniklerin kullanımı ağırlık kazanmaktadır. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar ayrı bir başlık altında incelenecektir.

2.3. Periodontal Yara İyileşmesi Prensipleri

Hücrel ve moleküler düzeyde vücudun en karmaşık yara iyileşmesi olarak tanımlanan periodontal yara iyileşmesinde, periyodonsiyumu oluşturan dokuların her biri kendi içinde ve aynı zamanda bir bütün olarak iyileşir [87]. Birbirleriyle uyum içindeki dört farklı dokudan oluşan periyodonsiyumdaki yara iyileşmesinin şeklini, yara bölgesine gelen hücre tipi belirler [16].

Dokuda deneysel insizyonu takiben yapılan gözlemlerde yara iyileşmesi üç faza ayrılmıştır [88, 89]. Bu fazlar, yumuşak dokuda iltihap, granülasyon dokusu ile hücrelerarası matris oluşumu ve bunun remodelasyonudur (Şekil 2.1). Bu süreç periyodonsiyumda oluşan bir yaralanma sonrasında da benzer şekilde gelişir.



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları [89]

Yaralanmayı takiben ilk saniyelerde yara bölgesinde fibrinojen gibi plazma proteinleri, hızlı şekilde birikerek fibrin pıhtısının dentine yapışmasını sağlar. Bir saat içerisinde, mukogingival flepten gelen nötrofiller pıhtıya infiltre olarak yumuşak doku iyileşmesinin erken iltihabi fazını başlatır. 6 saat içerisinde kök yüzeyine nötrofiller sıralanarak yaradan gelen bakteri hücrelerini ve parçalanmış doku hücrelerini fagosite ederler [89].

İnsizyondan üç gün sonra geç iltihabi faz başlar. Bu fazda, yara bölgesinde biriken fibrin pıhtısındaki polimorfonükleer (PMN) lökositlerin yerini makrofajlar alır. Makrofajlar ilk olarak dejenere olmuş PMN lökosit ve eritrositleri fagosite ederek temizlerken, diğer yandan fibroblastik ve endotelial hücreler, iltihabi sitokinleri ve doku büyüme faktörleri gibi aktif molekülleri salgılar. Bu moleküllerin varlığı iltihabi aşamadan granulasyon doku aşamasına geçişi gösterir [89]. Klinik görünümde ise mukogingival flep ile diş ve kemik arasındaki mesafe daralarak epitel flep kenarında ilerlemeye başlar. Eğer flep alveol kemiğine sıkıca adapte edilirse iltihabi yanıt daha az olur [90, 91].

İnsizyondan yedi gün sonrasına kadar geçen süreçte fibroblastların bölgeye akımı ile yeni damarların ve periodontal ligament bağ dokusunun oluştuğu hücreden zengin granülasyon dokusu oluşumu görülür [89]. Bu günlerde kök üzerinde hemidesmozom ve bazal lamina aracılığıyla epitelyal bağlantı oluşur. İyileşmenin ikinci haftasını takiben kök yüzeyine

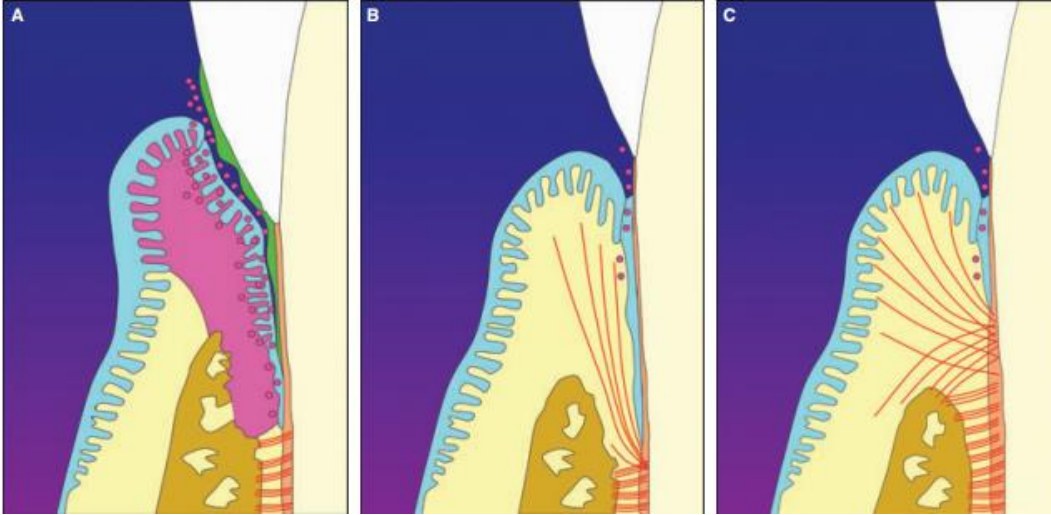
paralel olarak kollajen lifleri seyretmeye başlar. Henüz flep ile diş arasındaki bağlantı zayıf olmasına rağmen klinik görünüm neredeyse sağlıklıdır [90].

İyileşmenin son fazında (1-3 ay) ise hücreler ve matriks arasında görülen bağlantılar gerilim oluşturarak doku büzülmesine yol açar. Granülasyon dokusu fonksiyonel ihtiyaçlara göre remodelasyon ve olgunlaşma ile sonuçlanır. Bu fazda dişeti oluğu duvarı epitelize olmuştur ve birleşim epiteli oluşmuştur. Kret üzerindeki kollajen liflerin birikimiyle epitel hücreleri fonksiyonel dizilime ulaşmışlardır [16, 88, 90, 92, 93]. Böylece dişeti epitelinin ve altındaki bağ dokusunun iyileşmesi birkaç haftada sonuçlanırken, kök sementi ve alveol kemiği iyileşmesi haftalar hatta aylar sürmektedir[88].

Periodontal iyileşme değişik biçimlerde gerçekleşebilmektedir. Bunlardan biri periodontal dokularda tamir ile iyileşme olup, kaybedilmiş ya da hasara uğramış dokuların yapı ve fonksiyon olarak aynı özellikte olmayan dokularla doldurulmasıdır [94]. Periodonsiyumda bu süreç, dişeti ataşmanı ve kemik kazancı sağlamadan skar ile iyileşme olarak da adlandırılır. Flep kenarıyla kök yüzeyi arasındaki fibrin pıhtısının yerini yeni bağ doku ataşmanının kök yüzeyine yapışması ile “fibrin bağlantısı” (fibrin linkage) alır. Böylece periodonsiyumda oluşan tamir ile iyileşme uzun birleşim epiteli ile olmaktadır [94].

Caton, Nyman ve Zander maymunlarda oluşturdukları deneysel defektlerde dört farklı periodontal tedavi yöntemi uygulamış ve sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Kök yüzeyi düzleştirilmesi ve yumuşak doku küretajı, Widman flep operasyonu, Widman flep operasyonu ile beraber dondurulmuş otojen kırmızı ilik ve süngerimsi kemik veya trikalsiyum fosfat uygulamalarını takiben yaptıkları histolojik incelemelerde bu dört farklı tedavi yönteminin hepsinde uzun birleşim epiteli oluşumunu gözlemlemişlerdir [95].

Listgarten ve Rosenberg’in görüşüne göre uzun birleşim epiteli mikrobiyal ürünlerin alttaki bağ dokuya geçişini kolaylaştırmaktadır [96]. Uzun birleşim epiteli ile iyileşen bölgelerde eğer yeterli oral hijyen sağlanamazsa yeniden defekt tekrarlayabilir (Şekil 2.2. b). Barrington yaptığı çalışmada, uzun birleşim epiteli ile iyileşen dokunun bölgede yeni cep oluşumuna yatkınlık yarattığı, bunun da hastalığın ilerlemesine yol açabileceğini ileri sürmüştür [97].



Şekil 2.2. a. Periodontitis: Ataşman kaybı ve kemik rezorpsiyonu b. Uzun birleşim epiteli ile iyileşme c. Periodontal rejenerasyon: Kök yüzeyine yeni epitel ve bağ dokunun bağlanması

Periodontal cerrahi sonrası iyileşme, bağ dokusundan gelen hücreler ile olursa dişeti hacminde kayıpla beraber dişeti çekilmesi, periodontal cep oluşumu ve kök rezorpsiyonuna neden olur. Alveol kemiği hücrelerinin kök yüzeyi bölgesinde re-popüle olması ise kök rezorpsiyonu ve ankiloz ile sonuçlanabilmektedir [16].

Periodontal tedavi 1960'lı yıllarda sığ periodontal cep elde etmeye yönelik rezektif tedaviler üzerine iken, 1980'li yıllardan itibaren kaybedilen periodontal dokuların yeniden oluşturulmasına yönelik tedavi prensipleri geliştirilmeye başlanmıştır [98].

Periodontal hastalık sonucu periodontal ligament dokusunu kaybetmiş kök yüzeylerinde yeni sement ve içinde sonlanan kollajen liflerle karakterize bağ doku ataşmanının oluşmasına yeni ataşman denilir (Şekil 2.2 c) [16]. Dişeti bağ dokusundan kaynağını alan mezenkim hücreler, BMP'ler aracılığıyla osteoprogenitör hücrelere dönüşerek alveol kemiği oluşumu ile periodontal rejenerasyonu meydana getirir [99].

2.4. Periodontal Rejenerasyon

Rejenerasyon; hasar gören dokudaki hücrelerin çoğalma ve farklılaşması ile hücrelerarası matriksin üretilmesi, bunun sonucunda aynı özellikteki dokuyla doldurulmasına denmektedir. Rejenerasyon zedelenen doku hücreleri ya da onun prekürsörleri tarafından gerçekleştirilir. Periodontal rejenerasyonda amaç; yara bölgesine epitel ve dişeti bağ

dokusunun göçünü önleyerek sement, alveol kemiği ve periodontal ligamenti içeren diş destek dokularının yeniden oluşumunu sağlamaktır [90, 100, 101].

Bartold ve diğerleri (2000) periodontal rejenerasyonun oluşması için 4 önemli kriter bildirmişlerdir [1]. Bunlar;

1. Dokuların kuronalinde 2 mm'den fazla olmayan yeni bir epitelyal örtünün oluşturulması,
2. Yeni bağ dokusu liflerinin (Sharpey lifleri) açık kök yüzeyi içerisine girerek yeni periodontal ligament ve dentogingival ünitini meydana getirmeleri,
3. Ekstrinsik kollajen lifleri bulunduran hücresiz sement dokusunun kök yüzeyinde oluşması,
4. Mine-sement sınırının 2 mm. apikaline ulaşan alveol kemiği doludur.

Periodontal hastalık sonucu yıkıma uğramış dokuların bu kriterlere ulaşmasını sağlamak için günümüzde kullanılmakta olan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

1. Kemik ve benzeri materyaller (Sert Doku Greftleri)
2. Kök yüzeyi biyomodifikasyonu
3. Bariyer membranlar (YDR)
4. Mine matriks proteinleri ve büyüme faktörleri (Periodontal doku mühendisliği başlığı altında incelenmiştir.) [98].

2.4.1. Sert doku greftleri

Hasara uğramış bir dokunun tedavisi için vücut içine yerleştirilen canlı ya da cansız materyallere greft adı verilir [100]. Günümüze kadar pek çok çeşit greft materyalinden yararlanılmıştır. Kemik doldurucuları olarak da adlandırılan greftler; otojen kemik, allojenik ve ksenojenik kemik örnekleri ile alloplastik malzemeler periodontal rejenerasyonda kullanılmaktadır [102, 103].

Periodontolojide otojen kemik greftlerinin kullanımı, kemik gelişiminin desteklenmesi (osteokondüksiyon) ve kemik grefti içerisindeki hücreler ve proteinlerin kemik yapımıyla birlikte kök yüzeylerinde yeni sement ve fibröz ataşmanı uyarabileceği düşüncesine dayanmaktadır [90]. Kemik greftleri rejeneratif potansiyellerine göre de 3 başlık altında incelenebilir. Bunlar Çizelge 2.1'de açıklanmıştır.

Çizelge 2.1. Kemik greft materyallerinin osteojenik özelliklerine göre sınıflandırılması[104]

| |
|--|
| <u>Osteoproliferatif (Osteojenik):</u> Yeni kemiğin greft içinde bulunan hücreler tarafından yapılması (osteogenez) |
| <u>Osteokondüktif:</u> Greft materyalinin yeni kemik oluşturma özelliğine sahip olmamakla beraber komşu dokulardan gelecek kemik yapımı için iskelet oluşturmaları |
| <u>Osteoindüktif:</u> Kemik matriksi içindeki indükleyici proteinlerin kemik oluşumunu greft materyali çevresindeki yumuşak doku içinde başlatması. Bu tip kemikleşmede, matriks proteinleri mezenkim hücrelerinin kemik hücrelerine dönüşmesini indüklemeye rol oynar. |

Kemik greft materyallerinin periodontal rejenerasyonda kullanımının amacı, sondlanabilen cep derinliğini azaltmak, klinik ataşman kazancı elde etmek, kemik defektinin kemik ile dolumunu gerçekleştirmek ve böylece periodontal ligament, sement ve kemik dokularının rejenerasyonunu sağlamaktır [105].

İlk defa periodontal cerrahide kaybedilen dokunun rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kemik greftlerinin kullanılmasına, 1923 yılında Zoltan Hegedüs tarafından başlanmıştır. Hegedüs, periodontal hastalığa bağlı kemik kayıplarını önceleri ağız içi kaynaklı otojen kemik greftleri ile tedavi ederken, daha sonra ağız dışına yönlendirilerek yüzeyinde periost bulunan tibial kemik parçasını kullanmıştır [106].

Periodontolojide bugüne kadar otojen greftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik greftler olarak dört ana başlıkta toplanan çeşitli greft materyalleri kullanılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kemik greftlerinin sınıflandırılması [1, 16, 107]

| | |
|--------------------------------------|--|
| İnsan kaynaklı kemik greftler | |
| ▪ Otojen greftler; | |
| | a. Kortikal (osseous coagulum) b. Kortikal ve kansellöz kemik birleşimi c. Ağız içi ya da ağız dışı kaynaklı kansellöz kemik ya da kemik iliği |
| ▪ Allojen greftler-İzogreft | |
| | a. Taze dondurulmuş kemik b. Dondurulmuş-Kurutulmuş kemik allogreftleri c. Demineralize edilmiş dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri |
| Kemik yerine geçen greftler | |
| ▪ Ksenogreftler-Heterogreftler | |
| | a. Sığır kaynaklı hidroksiapatit b. Mercan kaynaklı kalsiyum karbonat |
| ▪ Alloplastik greftler | |
| | a. Polimerler b. Biyoseramikler |
| | i. Trikalsiyum fosfat ii. Hidroksiapatit |
| | c. Biyoaktif camlar |

Otojen iliak kansellöz kemik greftleri furkasyon, dehisens ve kemik içi defektlerde kullanılmış, böylece kemik dolumu elde edilmiştir. Geniş bir vaka raporu serisindeki otojen kemik uygulanmış defeklerin histolojik değerlendirmelerinde tam bir periodontal rejenerasyon sağlanamamakla birlikte, suprakrestal kemik oluşumu gerçekleştiği gösterilmiştir [108].

Otojen kemik grefti, canlı hücre içermesi, osteoindüktif etki göstermesi ve immün reaksiyon oluşturmaması nedeniyle başarılı olmakta, buna karşın postoperatif verici bölge ağrısı ve parestezisi, kök rezorpsiyonu ve ankiloza neden olması yüzünden sınırlı vakada kullanılmaktadır [107].

Urist ve diğerleri osteoindüktif olan kortikal kemik allogreftlerinin demineralizasyonu ile kemik matriksi içinde bulunan kemik morfojenik proteinlerin (BMP) salınmasını sağlayarak, greftin osteojenik potansiyelinin artırılabilirliğini göstermiştir [109, 110]. BMP'ler kemik matriksinin daha fazla olduğu kortikal kemikte yer aldıkları için, demineralize dondurulmuş kurutulmuş allogreftler (DDKA) çoğunlukla kortikal kemikten elde edilmektedir [105].

Greft materyalleri arasında DKA, DDKA ile ekstra ve intraoral otojen kemik greftlerinin periodontal rejenerasyonu sağladığına ilişkin histolojik bulgular vardır [105]. Demineralizasyon işlemlerinden dolayı osteoindüktif aktivitenin azalması veya kaybı, hastalık bulaşma riski, immün reaksiyona neden olması ve maliyeti allogreftlerin kullanımını kısıtlamaktadır [105].

2.4.2. Kimyasal kök yüzeyi biyomodifikasyonu

Periodontal cep ortamına açılmış kök yüzeyinde meydana gelen patolojik değişiklikler yeni ataşman oluşumuna engel olabilir. İlk kez Stahl ve diğerleri 1972 yılında kök yüzeyinin demineralize olması ile dentinde bulunan kollajen liflerinin açığa çıktığını, bölgedeki mezenkim hücrelerin sementoblastlara farklılaşarak yeni sementi oluşturacağını belirtmişlerdir [111, 112]. Bu nedenle periodontal tedavide diştaşı temizliği ve kök yüzey düzleştirmesine ilave olarak periodontal cebe komşu kök yüzeyinin biyolojik olarak uyumlu hale getirilebilmesi için bugüne kadar sitrik asit, tetrasiklin HCL ve EDTA kullanılmıştır [113-115].

Kök yüzeyine asitlerin ve özellikle sitrik asitin uygulanmasının in vitro ve hayvan çalışmalarında hücre migrasyonunu ve bağ doku ataşmanını artırdığı bildirilmiştir [94, 116, 117]. Sitrik asit periodontitise ait toksinleri yok ederken kök smear tabakasını kaldırır, böylece hipermineralize alanları yok ederek kökteki kollajeni açığa çıkarır [94]. Histopatolojik çalışmalarda kök yüzeyine sitrik asit uygulamasının iyileşme döneminde bir miktar bağ dokusu ataşmanını artırmasıyla birlikte kök rezorpsiyonuna neden olduğu saptanmıştır [113]. İnsanlarda 26 kemik içi periodontal defekte e-PTFE ile birlikte sitrik asit uygulayarak yapılan çalışmada, bu grupla kontrol grubu arasında klinik ataşman kazancı farkının bulunmadığı gösterilmiştir [118]. Bunlar dışında sitrik asit ile kökteki kollajenin açığa çıkması sonucunda, bu kök yüzeyine ECM glikoproteinlerinden olan fibronektinin uygulanmasıyla, klinik ataşmanın artırılabilceği görüşü ortaya atılmış [119], yeni ataşman, sement ve kemiğin oluşabileceği bulgulanmıştır [94].

Kök yüzeyi biyomodifikasyonunda kullanılmak üzere uygulanan tetrasiklinin, iyileşme sırasında kollajenaz enzimini inhibe etmesinin yanında antimikrobiyal ve demineralizasyon etkileri bulunmaktadır [120]. Ancak araştırmacılar tetrasiklin HCl uygulamasının periodontal rejenerasyonda fark yaratmadığını bulgulamışlardır [121]. Bir diğer ajan EDTA

ise günümüzde mine matris proteinleri ile klinik kullanımda yer bulmaktadır. Mayfield ve diğerleri (1998) kemik içi defektlerde YDR ile beraber EDTA kullanımında tek başına YDR uygulanan gruplara göre fark tespit edememişlerdir [114]. Araştırmacılar, kök yüzeyi biyomodifikasyonunun diğer rejeneratif teknikler ile birleştirilmesinin herhangi bir fark yaratmadığını ortaya koymuşlardır [121].

2.4.3. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR)

Geleneksel periodontal tedavi uygulamalarında flep operasyonu sonrası iyileşme, kök yüzeyi boyunca defekt tabanına kadar epitelin migrasyonu ile sonuçlanmaktadır. İyileşme sırasında diğer periodontal dokulara göre daha hızlı ilerleyen epitel ve dişeti bağ dokusu, rejenerasyon kapasitesine sahip esas hücreler olan periodontal ligament ve onu izleyen kemik hücrelerinin yerini doldururlar [122, 123].

Melcher (1976) periodontal cerrahi sonrası kök yüzeyine gelen hücrelerin iyileşmenin tipini belirleyeceğini belirtmiştir [5]. Nyman ve diğerleri fiziksel bariyerler kullanarak epitel ve dişeti bağ dokusu hücrelerinin yara bölgesinden uzak tutulmasının, periodontal ligament hücrelerinin kök yüzeyine doğru yönelmelerini sağladığı hipotezinden yola çıkarak buna yönelik deneyler yapmışlardır. Bu araştırmalarda periodontal hastalık nedeniyle ataşman kaybının olduğu bölgelerde bariyer membran uygulamasının kök yüzeyinde kollajen lifler ve sement oluşturduğu gösterilmiştir [124-126]. Bu çalışmalara ek olarak Karring [127], Gottlow [128], Magnusson ve diğerlerinin [129] yaptığı bir dizi çalışma ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda (YDR) periodontal ligament hücrelerinin bölgede re-popülasyonunun gerekliliği üzerinde yoğunlaşmıştır.

Lindhe ve diğerleri (1984) periodontal ligament ve sement dokularından yoksun kök yüzeylerine komşu alveol kemiğinin yeni bağ doku ataşmanı oluşturma potansiyellerini araştırmışlar, bunun için üç maymundaki keser dişleri çekmişler ve köklerin tek yüzeyindeki periodontal ligamenti kürete etmişlerdir. Araştırmacılar, bir grupta çektikleri dişlerin soketindeki bukkal duvar kemiklerini çıkarttıktan sonra dişlerin hepsini soketlere reimplante etmişler ve 6 ay sonra histolojik olarak incelemişlerdir. Çalışmada, alveol kemiği varlığı ya da yokluğu farketmeksizin periodontal ligamentin olmadığı bölgede fibröz ataşmanın oluşmadığı gösterilmiştir. Böylece araştırmacılar dişe komşu alveol kemiğin periodontal rejenerasyonda biyolojik bir katkısının bulunmadığını bulmuşlardır [130].

Caton ve diğerkleri (1987) periodontal rejenerasyonun histogenezini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; köpeklerde oluşturulan pencere defektlerini milipore filtreler (sellüloz asetat) ile örterek kök yüzeylerinde periodontal ligament ve alveol kemiği hücre repoplasyonunu desteklemeyi hedeflemişlerdir. Histolojik olarak 3., 7., 14. ve 35. günlerde yapılan değerlendirmelerde hem kontrol hem de deney grubunda yeni sement, kemik ve periodontal ligament oluşumunun 14. günde başlamış olduğunu, 35. günde ise defektlerde rejenerasyonun tamamlandığını göstermişlerdir. Ancak deney grubunda periodontal rejenerasyonun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bildirilmiştir [131].

YDR tekniğinin ilk klinik uygulaması Nyman ve diğerkleri tarafından 1982'de yapılmıştır [125]. Bu çalışmada, çekimine karar verilmiş ve mine sement sınırından itibaren 11 mm ataşman kaybı olan bir alt kesici dişe, kök yüzeyinin etrafını alveolar kretin üzerini örtecek ve mine sement sınırının kuronaline uzanacak şekilde milipore filtreler (sellüloz asetat) yerleştirilmiştir. Bukkal flep filtrenin üzerine kapatılarak sabitlenmiştir. 3. ayda alınan blok biyopsinin histolojik incelenmesinde periodontitisten etkilenmiş kök yüzeyinde 5 mm'lik yeni ataşmanın oluştuğu bulgulanmıştır. Bu sonuç, kuronal kemik kazancı yeterli bulunmasada, periodontal rejenerasyonda YDR tekniğinin uygulanabilirliğinin göstergesi olmuştur [125].

Periodontal yara iyileşmesi sırasında bariyer membran yardımıyla epitel ve bağ dokusunun bölgeye gelerek ataşman oluşturmasının engellenmesi sonucunda kök yüzeyi boyunca periodontal ligament hücrelerinin çoğalması sağlanmıştır. Bu fiziksel bariyer, kök yüzeyinde boşluk oluşturarak periodontal hastalık nedeniyle kaybedilmiş periyodonsiyumun yeniden kazanılmasını sağlar [132]. Bariyer membran yardımıyla oluşturulan bu teknik, klinikte periodontal rejenerasyonun sağlanmasında sıkça kullanılan bir teknik olarak günümüze kadar gelmiştir.

YDR'ye yönelik olarak üretilen bariyer membranlarda bulunması gereken bazı özellikler şu şekilde sıralanmaktadır [133, 134].

1. Biyoyumluluk: Rejenerasyonda kullanılacak materyal dokular tarafından biyolojik olarak kabul edilebilir olmalıdır. Buna biyoyumluluk denir. Materyal, immün cevaba, duyarlılığa ve iltihaba izin vermemeli, hastaya tehlike oluşurmamalıdır [133].

2. Membranın periodontal rejenerasyon için yeterli alan sağlaması gerekmektedir. Bazı materyaller yumuşak ve esnek olduğu için defektin içerisine çökebilir. Bu nedenle dış basınçlara karşı özel bir geometriye ve fonksiyonel rekonstrüksiyona sahip olmalıdır [133].

3. Oklüzivite (Kapayıcılık): Membran kök yüzeyine istenmeyen hücrelerin girişini engelleyerek boş bir alan sağlamalıdır. Membranı oluşturan materyalin biyolojik aktivitesi sadece içeriğine değil, gözenekliliğine bağlı olarak da değişebilir. Membran gözenekleri hücre gelişimi için sıvı, oksijen, besinler ve biyoaktif maddelerin difüzyonuna uygun büyüklükte olmalıdır.

Bu gözenekler epitel hücreleri ve dişeti fibroblastlarının membran içine geçişini engellemelidir. Büyük gözenekler hızlı üreyen hücrelere izin verirken, kemik ve periodontal hücrelerin geçişini kısıtlamaktadır. Aynı zamanda büyük gözenekler bakteriyel kontaminasyonun artışına ve bu kontamine membranların çıkarılması ise yumuşak doku oluşumuna neden olur. Eğer gözenekler küçük olursa, sınırlı hücre göçü, kollajen birikiminin artması, avasküler doku oluşumu ve kapiller gelişim ile infiltrasyon eksikliğine neden olabilir [135]. Bu nedenle oluşacak dokuya uygun gözenekliliğin belirlenmesi o dokunun rejenerasyonunda önemli rol oynar.

4. Doku bütünlüğü: Membranın dış yüzeyi epitelin hızlı gelişimini ve materyalin enkapsülasyonunu engellemeli, açılmış olan flep ile birleşebilmelidir. Warrar ve diğerleri (1992) maymunlarda doku bütünlüğünün önemi için yapmış oldukları çalışmada, çevresel (sirkumferensiyal) kemik içi periodontal defektlerde polilaktik asit membran kullanmışlardır. Ancak doku bütünlüğü eksikliğinden dolayı membranlar epitel tabaka ile örtülmüş ve enkapsüle olarak açığa çıkmıştır [136]. Bu nedenle uygulanacak membran dokunun bütünlüğünü sağlayarak rejenerasyonda görev almalıdır.

5. Uygun membran klinik gereksinimlere göre tasarlanmalıdır. Örneğin, membranlar defektin konturuna uygun yeterli alan sağlayacak şekilde olmalıdır [133].

YDR uygulamaları için geliştirilen materyaller rezorbe olan ve olmayanlar olarak iki gruba ayrılır. Bu membranların özellikleri hakkında genel bilgiler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Klinik çalışmalarda ilk defa uygulanan materyaller rezorbe olmayan membranlardır. Expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE-teflon)'den yapılmış membranlar geleneksel olarak kullanılan rezorbe olmayan materyallerdendir. Başlangıçta uygulamalarda yaygın olarak başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen son yıllarda bu malzemelere titanyum eklenerek rejeneratif hücrelerin çoğalması için boşluk yaratma özelliği artırılmıştır [137, 138].

Rezorbe olmayan membranların 4-6 hafta sonra ikinci bir operasyonla çıkarılmalarına gereksinim vardır. Bu aşamada yeni rejenera olan dokunun zedelenmesi ve bakteriyel kontaminasyon ile oluşabilecek enfeksiyon nedeniyle yara iyileşmesi gecikmekte ve düşük rejeneratif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir [139].

Araştırmacılar farklı özellikte bariyer membranlar oluşturarak membran özelliklerinin periodontal rejenerasyona katkısını araştırmışlardır. Crump ve diğerleri (1996) sıçanlarda yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada yüksek yoğunluklu teflon membranın (d-PTFE) poröz olmayan yapısı ve dokuyla bütünleşmesinin zayıf olmasından dolayı e-PTFE'ye göre dokudan çıkarılmasının daha kolay olduğunu belirtmişlerdir [140].

Lundgren ve diğerleri (1998) sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada silikon çerçeve ve farklı perforasyonlara sahip (10, 25, 50, 75, 100 ve 300 μm) 6 poliester mesh (plastik kapayıcı) yardımı ile kapatıcılık sağlamışlardır. Araştırmacılar, 4, 8 ve 12 haftalık histomorfolojik değerlendirmelerinde tamamen bloke edici bariyer membranlarda en yavaş kemik doku ogmentasyonu meydana geldiğini, $>10 \mu\text{m}$ den büyük perforasyonlarda ise daha hızlı kemik ogmentasyonları olduğunu göstermişler; ancak kemik yapım miktarında aralarında farklılık bulamamışlardır [141]. Bu çalışma ile iyileşmede gözenekliliğin kemik iyileşmesinden çok yeni kemiğin oluşum hızını etkilediğini göstermiştir.

Çizelge 2.3. Ticari olarak bulunan membranlar ve özellikleri [16, 135, 142]

| Ticari ismi ve içerikleri | Özellikleri | Yorumlar |
|---|----------------------------------|--|
| 1. Rezorbe olmayan bariyer membranlar (gözenek genişliği) | | |
| Gore-Tex: e-PTFE(genişletilmiş politetrafluoroetilen) | 0,5- 30 µm | Pek çok çalışma mevcuttur. |
| Cytoplast: d-PTFE (yüksek yoğunluklu politetrafluoroetilen) | 0,3µm'den küçük | Primer kapanma gerekli değildir |
| Cytoplast: Titanyum ile desteklenmiş yüksek yoğunluklu politetrafluoroetilen | 1,36µm'd en küçük | Kemik rejenerasyonu yeterli |
| 2. Sentetik rezorbe olabilen membranlar (rezorpsiyon süreleri) | | |
| Resolut LT: Poly-DL-lactid/ Co-glycolid | 8 hafta | Hücrelerin tutunması için poroz bir yapıdadır |
| Vicryl: Polyglactin 910 Polyglycolid/Polylactid 9:1w/w | 8 hafta | Oldukça iyi adapte olmaktadır. Rezorbe olmayanlara göre daha iyi sonuçlar |
| Atrisorb: Poli-DL-laktid ve çözücüsü N-methyl- 2 pyrolidon | 36-48 hafta | İyi adapte olabilen kişisel fabrike edilebilen membran |
| Guidor: Poly- DL- lactid/Poly-L- lactid/Asetilbütilsitrat | 24 hafta | Çift katlı membran dış yüzey: büyük gözenekli iç yüzey: ince gözenekli |
| OsseoQuest: Hydrolyzable Polyester | 16-24 hafta | İyi doku bütünlüğü |
| EpiGuide: Poly -DL- lactic acid | 24-48 hafta | Kan pıhtısı ile desteklenir |
| Biofix: Polyglycolic acid | 24-48 hafta | Bakteri ve epitel hücrelerine karşı bariyer olarak rol oynar |
| 3. Doğal-biyolojik olarak rezorbe olabilen membranlar (kollajenin kaynağı ve rezorpsiyon süreleri) | | |
| BioGide | domuz derisi (I ve III) 24 hafta | e-PTFE'ye iyi bir alternatif |
| BioMend Extend | sığır tendonu (I) 8 hafta | Kemik gelişimi ve hücre davranışı sınırlı |
| Cytoplast RTM | sığır (I) 26-38 hafta | |
| Alloderm: | insan derisi (I) 16 hafta | Hücresiz membran. Deri matriksi rehidre edilmelidir. Çoklu dişeti çekilmelerinde kullanılmaktadır. |
| Biosorb Membran | sığır (I) 26-38 hafta | Stabil bir uyum sağlar. |
| Neomem | sığır (I) 26-38 hafta | İki tabakalıdır. Nadir vakalarda kullanılmıştır. |
| OsseoGuard | sığır (I) 24-32 hafta | Estetik sonuçları geliştirir. |
| Ossix PLUS | domuz(I) 16-24 hafta | Örgülü kemiği artırır. |
| Jason Membran | domuz(I) perikardium 12-28 hafta | * |
| Collprotect membran | domuz (I) dermis 8-12 hafta | * |

*Henüz literatürde yapılmış çalışma bulunmamaktadır

Rezorbe olmayan membranların dışında, ikinci bir operasyona ihtiyaç duyulmaması ve yeni dokular oluşurken membranın çıkarılmasının bölgedeki iyileşmeyi etkilemesinden dolayı kollajen, poliglaktik asit, polilaktik asit ve bunların kopolimerleri gibi rezorbe olabilen membranlar da kullanılmaktadır [74, 143, 144].

Rezorbe olabilen membranlardan klinikte yaygın kullanılan kollajen membranların mekanik direncinin zayıf olması nedeniyle, bunlar bazı çapraz bağlayıcılar kullanılarak güçlendirilmiştir [74, 145]. Buna paralel olarak geliştirilen sentetik membranların rezorpsiyon süreleri uzun olduğundan yeni kemik rejenerasyonu için daha başarılı olabilecekleri düşünülmüştür [146, 147].

Kontrollü klinik çalışmalarda kollajen membranın postoperatif komplikasyonlarının az olması nedeniyle klinik kullanımda popülaritesini korumaktadır. Ancak klinik uygulamada mekanik stabilitesinin zayıflığından dolayı kemik greftleri ile beraber kullanımı yaygınlaşmıştır [148, 149]. Ayrıca ağız ortamına açıldığında membranın çıkarılamaması ve membran boyunca enfeksiyonun dokulara yayılma olasılığının bulunması kollajen membranların kullanımını kısıtlamıştır [150].

Murphy ve diğerleri (2003) yayınladıkları sistematik derlemede YDR'nin her iki kemik içi ve furkasyon defektlerinde tek başına flep operasyonlarına göre daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte bariyer membranların çeşidine göre sonuçların değişkenlik gösterdiği, greft materyalleri ile birlikte membran kullanımının ise klinik ataşman kazancını artırdığı ve sondlanabilir cep derinliğini azalttığı sonucuna varmışlardır [151].

Tonetti ve diğerleri (2004) yaptıkları çok merkezli randomize kontrollü klinik bir çalışmada, modifiye edilmiş papilla koruyucu flep tekniğinin etkinliğini, YDR ile beraber kemik greftlerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Araştırmada, modifiye papilla koruyucu tekniği uygulaması ve YDR ile greftlerin beraber kullanımının, klinik ataşman kazancı ve sondlanabilir cep derinliğinin azaltılmasında etkin bir yöntem olduğunu bulgulanmıştır [149].

YDR'nin uzun dönem sonuçlarının araştırıldığı klinik çalışmalarda ise, Pretzl ve diğerleri (2008) rezorbe olabilen ve olmayan membranların uygulandığı tedavilerde sonuçları 10 yıl sonra değerlendirmişlerdir. Araştırmada YDR amacıyla kullanılan her iki tür membran ile

tedavinin, 12 ay sonunda klinik ataşman seviyesini artırdığı, 10 yıl sonunda ise durumun halen korunduğu gözlenmiştir [152]. Bu sonuçlara benzer olarak Eickholz ve diğerleri ise (2007) kemik içi defektlere uyguladıkları rezorbe olan ve olmayan membranların 5 senelik klinik takip ile değerlendirdiklerinde, 50 kemik içi defektin 47'sinde klinik ataşman kazancının varlığını ortaya koymuşlardır [153].

Jepsen ve diğerleri (2002) ile Needleman ve diğerleri (2006) yayınladıkları derlemelerde, YDR'yi tek başına flep operasyonları ile karşılaştırdıklarında, YDR'nin 2 mm ataşman kazancı sağladığını ancak YDR tedavisi sonrası dişlerin ağızda kalması ile ilgili herhangi bir veri bulunmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar klinik çalışmalardaki değişkenliklerden dolayı YDR'nin klinik başarısı hakkında net bir bilginin literatürde yer almadığını kaydetmişlerdir [13, 154].

Ivanovski ve diğerleri (2009) yaptıkları çalışmada YDR'nin greftlerle beraber kullanımının daha etkili olduğunu; dişin prognozu, dişin bulunduğu bölge gibi etkenlerden dolayı hasta seçiminin ve tedavi planlamasının önemini belirtmişlerdir [155]. Diğer yandan YDR ve greft uygulamasının uzun dönem sonuçlarının çok değişkenli olduğunu ve klinik yararlılığın yeterli olmadığını savunan çeşitli görüşler de bulunmaktadır [156, 157].

YDR uygulamaları sonrası elde edilen ataşman miktarının her vakada aynı olmadığı ve rejenerasyonun sınırlı kaldığı görülmüştür [19]. Yetersiz plak kontrolü, sigara kullanımı, oklüzal travma, yetersiz keratinize doku ve doku kalınlığı, defektin duvar sayısı ve derinliği gibi hastaya bağlı faktörler, kök ile bariyer membranın birleşiminin yetersizliği, steril koşullarda yapılmayan cerrahi işlemler, membranın erken dönemde ekspoz olmasına veya dokuya yeterince adapte edilmemesi gibi hekime bağlı faktörlerin periodontal rejenerasyon potansiyelini etkileyebileceği belirtilmiştir [103, 152].

YDR amacıyla kullanılan membranlarla istenilen sonuçların elde edilebilmesinde yetersiz kalınması nedeniyle, yeni periodontal tedavi stratejileri geliştirilmeye başlanmış, araştırmalar biyolojik mediatörlerin üzerinde yoğunlaşmıştır. Periodontal yara iyileşmesinde istenilen hücrelerin bölgeye göç etmesi sağlanarak, bölgede çoğalması ve yeni doku oluşturulması için çeşitli biyolojik mediatörlerin araştırılmasına gerek duyulmuştur. Klinikte biyolojik ajan olarak mine matriks proteinleri, büyüme faktörleri, trombosit zengin plazma, trombosit zengin fibrin gibi çeşitli ajanlar kullanılmaktadır [111]. Bir diğer

gelişmekte olan yaklaşım ise dokuların yerini dolduracak ekstrasellüler matriks prototipleri oluşturarak, bu sinyal molekülleri ile farklı hücre tiplerinin bölgede uygulanmasıdır [1].

2.5. Periodontal Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği yaklaşımı; çeşitli kaynaklardan elde edilen hücrelerin ve büyüme faktörlerinin, taşıyıcılar aracılığıyla hastalık ya da travma sonucu kaybedilmiş veya hasar görmüş dokulara yerleştirilerek bu dokuların yeniden kazanılmasını hedeflemektedir.

Doku mühendisliği, hücresel ve moleküler biyoloji, genetik, kimya, materyal bilimi ve mühendisliğini içeren interdisipliner yeni bir bilim dalıdır. “Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1987 yılında Washington’da yapılan Ulusal Bilim Kurumu (NSF) tarafından Biyomühendislik Konferansında ortaya konmuştur. Bu terim 1988 yılında Skalak ve Fox’un editörlüğünde yayınlanan “Tissue Engineering” kitabında şu şekilde tanımlanmıştır: *“Normal ve patolojik memeli dokularındaki yapı-fonksiyon ilişkisinin temelini oluşturan hayat bilimi ve mühendisliğin prensiplerinin uygulanması ve doku fonksiyonlarının geliştirilmesi, sürdürülmesi ve tamir edilmesine yönelik biyolojik doku benzeri yapıların geliştirilmesidir”* [158, 159].

Nerem [160] 1991 yılında hücre mühendisliği konusunda, Langer ve Vacanti [45] ise 1993 yılında doku mühendisliği başlığı altında günümüzün bu yeni bilim dalına öncülük etmişlerdir.

Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü’ne (NIH) göre doku mühendisliğinin amacı; fonksiyonel yapıları birleştirmek, korumak, hasarlı dokuların veya organların tamamını geliştirmektir. Yapay deri ve kıkırdak, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış mühendislik dokularına örnektir. Ancak şu anda insanlarda kullanımı henüz sınırlıdır [161].

Hücreler dokuların yapı taşıyken, dokular ise vücudun temel birimidir. Hücre grupları kendi destek yapılarını oluşturur, buna ekstrasellüler matriks (ECM) denilmektedir. Bu matriks hücreleri desteklemenin yanında, çeşitli sinyal verici moleküller için bir istasyon olarak işlev görür. Böylece hücreler yerel çevreden gelen pek çok uyarıyı alabilirler. Hasarlı dokuların

onarılması, hatta yenilerinin yaratılması için hücre grupları etkileşme süreci başlatarak doku yapımını düzenleyebilmektedirler [162].

Doku mühendisliği prensipleriyle ECM benzeri yapılar üretilmeye ve araştırılmaya başlanmıştır. Doku iskelesi adı da verilen bu matrikslerin üretiminde proteinlerden polimerlere kadar değişen çeşitli moleküller kullanılmıştır. İskelelerin oluşturulmasından sonra hücreli ya da hücreli olarak büyüme faktörleri ile devam etmektedir. Hücreler, iskeleler ve büyüme faktörleri biraraya gelirken, aynı anda “kendi kendine inşa olan” (self-assemble) dokuları meydana getirirler [98, 162, 163].

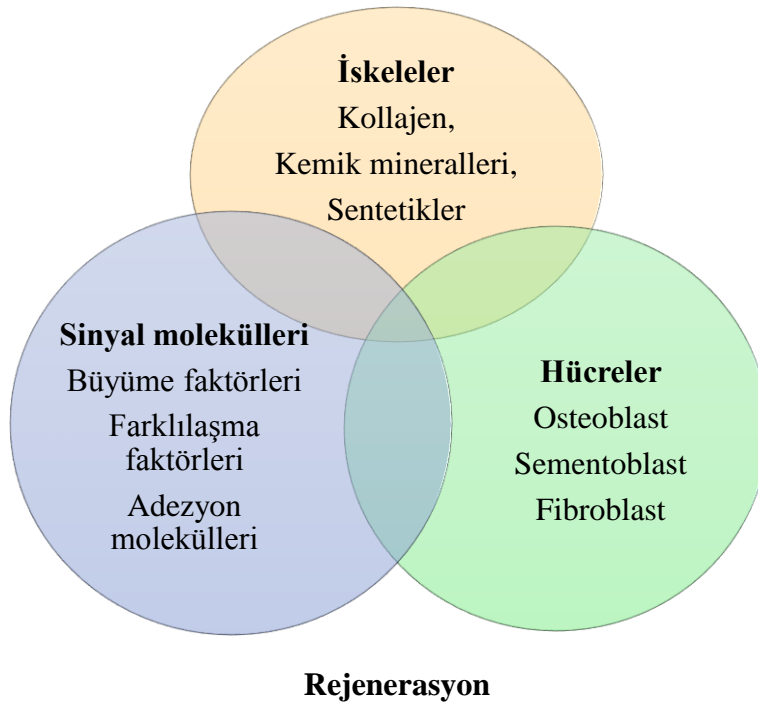
Doku mühendisliği üç ana unsurdan oluşur [164]. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz:

1. Ex vivo olarak oluşturulan hücreler (otolog ya da allojenik)
 - a. Doku özelliğine göre farklılaşan hücreler
 - b. Kök hücreler: Erişkin (somatik), fetal (embriyonik)
2. Uygun bir iskele yapısı ya da taşıyıcı materyal
 - a. Poröz, eriyebilen, süngerimsi biyomateryaller; membranlar, tüpler
 - b. Nanopartiküller
3. Doku oluşumu ve hücreli farklılaşmayı indükleyen biyoaktif moleküller ve düzenleyiciler
 - a. Büyüme faktörleri
 - b. Büyüme faktörlerini oluşturan genler
 - c. Büyüme inhibitörlerinin antagonistleri
 - d. Mekanik yükleme
 - e. Hidrostatik basınç
 - f. Sıvı akışı
 - g. Şok dalgaları ve ultrason
 - h. Elektromanyetik radyasyon

Periodontal doku mühendisliği yaklaşımında, araştırmacılar tarafından ortak görüş ve geçerli bir anlayış olmamakla birlikte, doku mühendisliğinde kabul edilen unsurları içermektedir [165]. Bartold'a göre (2000) periodontal doku mühendisliğini YDR ile ayırt etmek gerekir. Araştırmacıya göre periodontal doku mühendisliği periyodontisyumda bulunan hücreleri ya da büyüme faktörlerini barındıran üç boyutlu bir yapının defekt bölgesine yerleştirilmesidir. Üç boyutlu taşıyıcı iskele uygun hücre ya da büyüme faktörleri ile günümüzdeki periodontal rejeneratif tedavilerin eksikliklerini ortadan kaldırabilir [1]. YDR ise, hücreli bir iskeleyi alıcı dokuya yerleştirerek dokunun kendiliğinden oluşması esasına dayanır [98]. Klasik YDR

uygulamalarında sadece kaybedilen dokuya ait boşlukların doldurulması sağlanırken, doku mühendisliği yaklaşımında amaç büyüyen, gelişen ve canlılığını koruyabilen organları elde etmektir[166]. Günümüzde organ nakillerinin yerini almak üzere üretilen bu doku mühendisliği ürünleri, periodonsiyumda dokuların oluşum ve rejenerasyon mekanizmalarının anlaşılması sonucunda bölgede görev görebilecek yapıların yeniden geliştirilmesini hedeflemektedir.

Doku mühendisliği kullanımının yaygınlaşması için iki ana kriterin yerine getirilmesi gereklidir. Bunlardan ilki, taşıyıcı iskelenin mimari yapısı ve boşluk sağlama gibi biyomekanik özelliklerinin uygun olması gerekir. İkincisi ise, mühendislik ürününün kültür ortamında hücre canlılığı ve çoğalmasını; implante edilen bölgede ise yeni damarlanma ve büyüme faktörlerinin dağılımı ile doku rejenerasyonunu sağlaması gerekir [98] (Şekil 2.3).



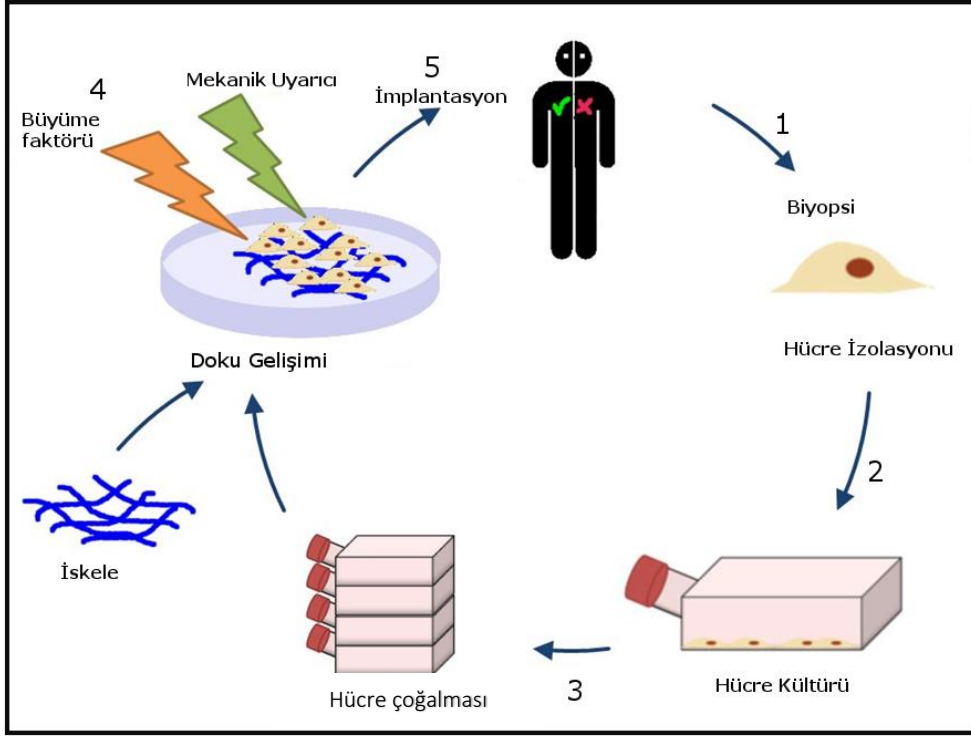
Şekil 2.3 Periodontolojide tanımlanan doku mühendisliği [98]

2.6. Hücre Tedavisi Yaklaşımı

Doku mühendisliğinde kullanılan hücre tedavileri, taşıyıcı ile beraber büyüme faktörlerinin defekte dağıtımı ve hücresel yapılardan dokuların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu önerilen strateji genel ismi ile hücre tedavisi yaklaşımı olarak kabul edilir [167].

Hücre tedavisi yaklaşımı aşamalarını Şekil 2.4'te özetleyebiliriz:

1. Kaynaktan doku elde edilmesi ve hücre izolasyonu
2. Hücre ekimi
3. Uygun kültür ortamında sayılarının çoğaltılması
4. Biyosinyal molekülleri ile birlikte doku iskelesine ekimi
5. Dokunun hasarlı bölgeye implante edilmesi



Şekil 2.4. Hücre tedavisi yaklaşımı

Hücre tedavisi yaklaşımında somatik (erişkin) ya da kök hücreler kullanılabilir [165]. Somatik hücreler; toplanabilir, kültüre edilebilir ve implante edilebilir. Somatik hücrelerde kök hücrelerde görülen kendini yenileme kapasitesi olmadığı için bu hücrelerin kullanım alanları sınırlıdır. Doku mühendisliğinde dişeti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinden oluşan periyodonsiyumun rejenerasyonunu sağlamak amacıyla osteoblastlar, periost hücreleri, sementoblastlar ve periodontal ligament hücreleri kullanılmaktadır.

Hücre tedavisi yaklaşımı ile yapılan ön çalışmalarda periodontal bölgelere immünolojik ya da iltihabi sonuçlar doğurmadan periodontal ligament ve kemik hücrelerinin yerleştirilebileceği gösterilmiştir [63-66].

Periyodonsiyumun elemanlarından biri olan alveol kemiğinin rejenerasyonu için görev alan başlıca hücreler osteoblastlardır. Osteoprogenitör hücreler kemik iliği stromasından elde

edilen öncü mezenkimal hücreler tarafından ortaya çıkar [104]. Osteoprogenitör hücrelerde, farklılaşmalarında rol oynayan paratiroid hormon, östrojen, glukokortikoid gibi hormonlara duyarlı reseptörler vardır [104]. Osteoblastların osteoprogenitor hücrelerden gelişimi ve farklılaşması kemik morfojenetik proteinlerin (BMP), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), plateletten türeyen büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi osteoindüktif ve osteopromotif büyüme faktörlerinin salınımına bağlıdır [104].

Osteoblastlar şekillenmekte olan kemik trabeküllerinin ve lamellerinin yüzeylerinde tek sıra halinde epiteloit dizilmişlerdir. Aktif şekilleri kübiktir ve bazofil boyanırlar. Salgıladıkları osteoit madde yönünde sitoplazma uzantıları yaparak; diğer hücrelerin uzantıları ile ilişki kurarlar [104]. Mineral matriksin çökmesiyle uzantıların bulunduğu yerlerde kanalcıklar oluşur, kemik yapımı ilerlediğinde ise doku içinde kalarak osteositlere dönüşürler. Bu hücreler kemik matriksinin organik kısmını yani kollajen lifleri ve glikozaminoglikanları salgırlar. Bunlar matriks yapısının mineralizasyonunu kontrol ederler, kalsiyum, fosfat gibi minerallerin kan düzeylerinin homeostazında da görev alırlar [104].

Osteoblastların immunojenik yanıt vermemeleri ve biyopsi ile kolay elde edilmeleri gibi avantajları bulunur. Ancak az miktarda elde edilebilmeleri ve hücrelerin çoğaltılmasının zorluğu dezavantajlarıdır. Bugüne kadar kemik rejenerasyonu için kullanılan osteoblast hücrelerine farklılaşması için embriyonik, kemik iliği, kordon kanı, adipoz doku, kas ve dental pulpa kaynaklı çeşitli kök hücreler kullanılmıştır [168].

Kök hücreler tüm çok hücreli organizmalarda bulunan, kendini yenileyebilme (mitotik bölünme) ve değişik hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip olan primitif hücrelerdir [167]. Embriyonal kök hücreler totipotent¹ ve pluripotent² özelliğine sahiptir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda bu hücrelerin kardiyomyositlere, hematopoetik hücrelere, endotel hücrelerine, nöronlara, kondrositlere, adipositlere ve osteoblastlara farklılaştıkları gösterilmiştir. Ancak embriyonik kök hücrelerin kullanımındaki etik sorunlar, teratom veya benzeri tümör oluşumlarına yol açması, immünolojik olarak dokunun reddi gibi sorunlardan ötürü klinik amaçlarla kullanılmamaktadır [167].

¹ Sınırsız farklılaşma: Dölleniş yumurtanın ilk birkaç bölünmesiyle meydana gelen hücreler de totipotenttir.

² Birden fazla doku/hücre tipine farklılaşmaya pluripotent denir.

Erişkin kök hücreler, doku ve organlarda farklılaşmış hücrelerle birlikte bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bunlara somatik kök hücre de denilmektedir. Bu hücreler, unipotent¹ yapısındadırlar. Erişkin kök hücrelerinden en sıklıkla kullanılan hücre grubu kemik iliği stromal hücreleridir. İnsanda; kemik iliği, yağ dokusu, karaciğer, kas, dermis, periferik kan hücreleri, ağız içi alanlarda ise; dental pulpa ve periodontal ligament hücreleri mezenkimal kök hücrelerin kaynağını oluşturmaktadır [169].

Kemik iliği stroması hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerine sahiptir. Bunlara kemik iliği stromal hücreleri (BMSC) denir. Hematopoetik kök hücreleri her tipteki kan hücrelerinin artmasına neden olurken, mezenkimal kök hücreler (MKH) in vivo olarak transplante edildiğinde yenilenme potansiyeli daha fazladır. Eski bilgilerin aksine kök hücrelerin buldukları doku hücrelerinin dışındaki hücelere de farklılaşabileceği belirlenmiştir. MKH'lerin, osteoblastlar, kondroblastlar, adipositler, miyositler ve fibroblastlara farklılaşma potansiyeli bulunur [167].

Kemik iliği stroma hücreleri deksametazon, inorganik fosfat ve askorbik asit ile muamele edildiklerinde osteoblast benzeri hücelere farklılaşarak, osteokalsin, osteopontin, paratiroid hormon reseptörü gibi osteojenik hücelere ait belirteçlerin salınmasına yol açarlar [170].

Kemik dokusu oluşturulmasına yönelik doku mühendisliği çalışmalarında kolay çoğalabilen ve farklılaşmaları yönlendirilebilen MKH sıklıkla kullanılmaktadır. MKH'lerin implante edildiği ektopik bölgelerdeki kemik formasyonunu rapor eden çalışmalarda, MKH'lerin en önemli farkı osteoindüktif moleküllerin üretimidir [171, 172]. Mezenkimal hücrelerin osteojenik hücre hattına dönüşebilmesi için *Osf2/Cbfa1* geninin aktivasyonuna ihtiyaç duyar. Bu gen de osteokalsin, osteopontin, kemik sialoprotein ve kollajen sentezini sağlayan başlıca gendir. *Osf2/Cbfa1* geni BMP-7 ile indüklenir, vitamin D3 ile baskılanır. *Osf2/Cbfa1* geninin mutasyonu kleidokraniyal displazilere ve iskeletsel anomalilere neden olabilmektedir [173].

Kemik doku mühendisliği çalışmalarında, mezenkimal kök hücreler dışında MC3T3-E1 (fare pre-osteoblast hücre hattı), SAOS-2 (insan sarkoma hücre hattı) ve UMR-106 (sıçan

¹ Tek bir yönde farklılaşmaya unipotent denir.

osteosarkoma hücre hattı) gibi osteoblast benzeri hücre dizileri taşıyıcı iskelenin biyouyumluğunu değerlendiren araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır [174-176].

Doğan ve diğerlerinin (2002) somatik hücreleri doku mühendisliği amacıyla kullandıkları pilot çalışmalarında, periodontal ligamentten fibroblastlar üreterek transplantasyon amacıyla kullanmışlardır. Çalışmada, köpeklerde oluşturdukları mandibular klas II furkasyon defektlerine otolog plazma içinde periodontal ligament fibroblastlarını yerleştirmişlerdir. Sonuçta, hücre ekilen tarafta kemik ve sement oluşumunun kontrol grubuna göre daha başarılı bulunduğunu ortaya koymuşlardır [63].

Doğan ve diğerleri (2003) yaptıkları bir diğer çalışmada ise, otolog plazma içindeki periodontal ligament fibroblastlarını deneysel pencere şeklindeki periodontal defektlere uygulamışlardır. Çalışmanın 42 günlük histomorfometrik incelemesinde fibroblastların periodontal defektlerin içinde açığa çıkmış dentin yüzeylerinin üzerinde sınırlı düzeyde sement oluşturduğunu, bununla beraber fibroblastların bağ doku adaptasyonu ve yeni kemik rejenerasyonunu sağladığını bulgulamışlardır [64].

Yumuşak doku tedavilerinde allojenik fibroblastlar mukogingival defektlerde keratinize doku formasyonunu etkilemektedir. Bir doku mühendisi ürünü olan neonatal keratinositler ve fibroblastlardan oluşan canlı hücresel yapı (LCC) konvansiyonel dişeti otogreftlerine benzer klinik sonuçlar vermektedir. LCC yara iyileşmesi sırasında güçlü anjiyojenik cevaplar verdiği için kullanımında yüksek potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [177].

Zhao ve diğerlerinin (2004) yaptıkları çalışmada sementoblastları, periodontal ligament fibroblastlarını ve diş folikül hücrelerini üç boyutlu polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) taşıyıcılarına ekmişlerdir. Araştırmacılar, diş folikül hücrelerinin kemik hücrelerine dönüşümünü inhibe ederken, immortalize sementoblastların ise büyük periodontal defektlere uygulandığında kemik köprüsü ve PDL formasyonunu oluşturduğunu göstermişlerdir [178].

İlk kez 2004 yılında Seo ve diğerleri, periodontal ligament kök hücrelerinin adipositler, osteoblast benzeri hücreler, sementoblast benzeri hücrelere farklılaşabildiğini göstermişler, bu hücrelerin immun sistemi baskılanmış sıçanlara transplante edildiğinde ise sement ve periodontal ligament benzeri dokular ile Sharpey liflerini oluşturduğunu gözlemişlerdir.

Çalışmada, periodontal hastalıklarla kaybedilmiş periyodonsiyumun tedavisinde ex-vivo oluşturulan kök hücre transplantasyon tedavisinin ümit verici olduğu görülmüştür [179]. Liu ve diğerleri (2008) yaptıkları bir çalışmada, çekilmiş premolarlardan elde edilen otolog periodontal ligament hücrelerini hyaluronik asit taşıyıcısı ile beraber ısıya duyarlı hücre kültürü tekniği kullanarak katman oluşturmuşlardır. Araştırmacılar domuzların molar dişlerindeki deneysel defektlere uyguladıkları otojen periodontal ligament kök hücrelerinin, yeni kemik, sement ve periodontal ligamentten oluşan periodontal ataşman aparatını sağladığını göstermişlerdir [180].

Son zamanlarda “hücre tabaka mühendisliği” (cell sheet engineering) üzerine periodontal ataşman yapısını sağlayacak pek çok çalışma yürütülmektedir. İlk olarak Yamato ve Okano tarafından öne sürülen bu yaklaşım doku oluşumunu tek hücre yerine hücre tabakaları oluşturma fikrine dayandırmaktadır. Geleneksel tekniklerin yanında yüzeyden kaldırma işlemi sırasında tripsin ya da lipaz gibi enzimler kullanılırken, bu enzimler ECM ve hücreler arasındaki bağlantıyı ayırırlar. Enzimatik bozunumu engellemek amacıyla poli (N-izopropil akrilamid) PIPAAm polimeri kullanılır. Bu polimer, 32°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yapısındaki suyu kaybederek büzülür, proteolitik enzimler olmadan sıcaklık 32°C'nin altına düştüğünde ise yapısına tekrar su alarak şişer. Konflüensa ulaşılmış olan bu hücreler ECM üreterek hücre-hücre bağlantısı ile hücre tabakasının oluşumunu sağlar [181].

Hasegawa ve diğerleri (2005) atimik sıçanlarda yaptıkları çalışmada üst birinci molar dişlerde oluşturdukları bilateral dehisens defektlerine insan kaynaklı üretilen PDL hücre tabakaları uygularken, diğer tarafı kontrol grubu olarak boş bırakmışlardır. Cerrahi sonrası dördüncü haftadaki histolojik incelemelerde, PDL hücre tabakası uygulanan tarafta hücresiz sement ve ligamente benzer rejenere dokular gözlenirken, kontrol tarafında kök rezorpsiyonu ve ankiloz gelişmiştir. Bu çalışma ile PDL hücre tabakasının uygulanabilirliği gösterilmiştir [182].

Tsumanuma ve diğerleri (2011) periodontal ligament, alveolar periost ve kemik iliğini karşılaştırmak amacıyla köpeklerde kanin tek duvarlı kemik içi defektleri oluşturmuşlardır. Çalışmada, poliglikolik aside ekilen üç katlı hücre tabakasını otojen olarak kök yüzeylerine yerleştirmişlerdir. Arkasından defekt poröz β -TCP ve kollajen greftleri ile doldurularak 8 hafta sonra değerlendirilmiştir. Çalışmada defektte oluşan alveol kemiği, yeni sement ve

periodontal ligament incelendiğinde; periodontal ligament kök hücreli olan grup, diğer iki gruba göre periodontal rejenerasyonun gerçekleştirilmesinde daha iyi sonuç vermiştir [183].

Fonksiyonel ve estetik olarak yerine konan ve dokuları destekleyen doğal diş üretimi halen ütopiktir. Sonoyama ve diğerleri (2006) yapay diş üretimi konusundaki pilot olan çalışmalarında PDL kök hücreleri ile kombine apikal papilla kök hücrelerini hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat taşıyıcı içerisinde ex vivo üretimini yaparak “biyolojik kök” oluşturmuşlardır. Çalışmada immün sistemi baskılanmış sıçanların alt keser dişlerine, bu biyolojik kök nakledilerek, üzeri kuronla örtülmüştür. 8 hafta sonunda sıçanlardan elde edilen histolojik kesitlerde sement ve Sharpey liflerinin oluştuğu görülmüştür. Araştırmacılar, dental kök hücrelerinin otolog transplantasyonunun uzun dönemde klinik dental implant prosedürlerine alternatif oluşturabileceğini belirtmişlerdir [56].

2.7. Doku iskeleleri

Doku iskeleleri; hücelere dayanıklılık ve tutunması için yüzey sağlayan, fizyolojik ve biyolojik değişkenlere cevap verebilen, hedef dokudaki matriksi taklit eden bir yapı olarak özetlenebilir.

2.7.1. Doku iskelelerinin fabrikasyonu

Mironov ve diğerleri (2009) hücre tedavisi yaklaşımlarında kullanılan doku iskelelerinde aranan temel özellikleri şu şekilde özetlemiştir [184]:

1. Hücrelerin üremesi, tutunması ve çoğalması için sert bir malzeme olmalıdır.
2. Doku iskelesi organa özel şekilde üretilmelidir. Bu nedenle iskele sert, ancak şekil verilebilir olmalıdır.
3. Sadece hücre ataşmanı değil, aynı zamanda büyüme, migrasyon ve farklılaşma sinyallerini dokuya sağlamalıdır.
4. Poröz yapısı damarlanmaya, doku iskelesinin canlılığına ve hücre kültürüne uygun olmalıdır.
5. Başlangıçta iskelenin, mekanik olarak dokuya şekil vermesi beklenirken, biyobozunma sonucunda in vitro ve in vivo olarak sentezlenen parenkimal ve stroma hücreleriyle yeniden yapılanmalıdır.

Biyomalzemelerin en önemli amacı doku ile uyumlu olması ve konak yanıtında inflamasyona yol açmayarak indüktif etki sağlamasıdır. Bu amaca yönelik olarak doku mühendisliğinde biyouyumluluğu ve konak dokunun organik matriksine benzerliği

nedeniyle doğal polimerler; kolay işlenebilir özellikleri, yüksek mekanik dayanımları ve uzun rezorpsiyon süreleri nedeniyle sentetik polimerler; kemiğin inorganik bileşenleriyle olan benzerlikleri ve osteokondüktivitesi nedeniyle biyoseramikler doku iskelesi malzemesi olarak kullanılmaktadır [57].

Doku iskelesinin biyouyumluluğu öncelikle vücutta immun ve toksik reaksiyona neden olmaması demektir. Bunun yanında iskeleye hücrelerin infiltrasyonu ve oluşan dokunun damarlanması sonucunda, konak doku bütünlüğünü sağlaması açısından önem kazanır. Biyouyumluluk özelliklerinden bir diğeri olan hidrofilik özellik, hücrelerin tutunmasını ve yayılmasını etkileyen özelliklerdendir [185, 186].

İç bağlantısı olan ve kontrol edilebilen gözeneklilik de doku iskelelerinde aranan özelliklerdendir. Gözeneklilik, hücrelerin doku iskelesinin içine yapışarak nüfuz etmesi, yayılması, üremesi, besinlerin aktarımı, atıkların uzaklaştırılması ve damarlanmanın gerçekleştirilmesi için önemlidir. Yapılan çalışmalarda 200-400 µm lik gözenek boyutlarının kemik rejenerasyonu için ideal olduğu gösterilmiştir [57, 187].

Doku iskelesi malzemesi vücutta bozunmaya ve rezorpsiyona uğrarken, aynı zamanda dokuda gerekli olan boşluğu sağlar. Dokudaki hücrelerin iskeleye tutunması sağlandıktan sonra hücreler, hücre dışı matriksi sentezleyerek doku rejenerasyonunu gerçekleştirirler [188].

Özellikle kemik doku mühendisliği için geliştirilen doku iskelelerinin en önemli özelliği mekanik dayanıklılıktır. Materyalin biyobozunurluğu hedef dokunun gelişmesine paralel olmalıdır. Kemik dokusu için hazırlanan doku iskelesinin geç dönemde, yumuşak doku için ise daha erken yıkıma uğraması istenir [189].

Doku iskelesinde aranan bir diğeri özellik ise yumuşak dokuya iyi adapte olması ve yumuşak doku ile örtülmesinin gerekliliğidir. Doku iskelesinin sterilize edilebilmesi, kolay şekillenebilir ve uzun süre saklanabilir olması ile ticari olarak üretilebilmesi önemlidir [190].

Doku iskelelerine büyüme ve farklılaşma faktörlerinin eklenmesi ve ortamda uygun salım kinetiğinin oluşması önemlidir. Yara iyileşmesi sürecine uyumlu şekilde dozu ve uygulama süresi ayarlanan faktörlerin seçilmesi başarıyı artırır [190].

Büyüme faktörlerinin taşınmasında da kullanılan bu iskeleler fiziksel ya da kimyasal şekilde bağlanarak bölgeye özgü salım yapabilir. Periodontal doku mühendisliği amacıyla büyüme faktörlerinin bölgeye verilmesinde çeşitli taşıyıcı iskeleler kullanılmakta olup, günümüzde en yaygın kullanılan EMD'dir. EMD'nin jel formda olması ile bölgeye kolay uygulanabilirliği, çevre sert ve yumuşak dokuya uyumlu olabilmesi greft materyalleriyle beraber kullanımında iyi bir kombinasyon oluşturmaktadır. Araştırmalarda sık kullanılan jel formu, hekimin cerrahi operasyon süresini azaltması ve hastada daha az postoperatif ağrıya neden olması gibi avantajlarına karşın materyalin mekanik dayanımı ve gözenekliliğinin zayıf olması kullanımını kısıtlamaktadır [60].

Periodontal defektlerde iskelelerin farklı kullanım endikasyonlarının olabileceği belirtilmiştir. Örneğin tek duvarlı kemik içi defektlerde, şekli önceden tasarlanmış kişiye özel yapılar ya da mekanik direnci yüksek iskele yapıların kullanımı tercih edilirken, iki ya da üç duvarlı kemik içi defektlerine enjekte edilebilen formdaki jellerin kullanımı rejenerasyonu sağlayabileceği belirtilmiştir [191].

2.7.2. Doku iskeleleri üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Materyalin doğru seçimi doku mühendisliği ürünlerinin tasarımında ve uygulanmasında önemli rol taşımaktadır. Biyomalzemelerin günümüzde en önemli seçim kriteri doku rejenerasyonu için doku ile etkileşime geçmesidir. Periodontal doku mühendisliğinin amacı kullanılan biyomalzemenin bozunması ile senkronize şekilde yeni periodontal ataşmanın yerini almasıdır [192].

Doğal polimerler vücuttaki ECM'ye olan benzerlikleri, yüksek biyouyumlulukları, düzenli poröz bir yapıya sahip olmaları, herhangi bir immün reaksiyona neden olmamaları nedeniyle doku iskelesi olarak tercih edilmektedir. Doğal polimerler arasında kullanılan polimerler kollajen, jelatin, matrijel, fibrin, aljinat, sellüloz, kitosan, hyaluronik asit ve ipek fibroindir [193].

Kollajen, vücutta en çok bulunan hücre dışı matriks proteindir. Osteoblastlardan salgılanan tip I kollajen kemik yapısının organik bir bileşenidir. Kollajen, hücrelerin büyüme karakterlerini etkilerken, hücre tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eder [194, 195]. Bunun yanında kollajenin por büyüklüğünden kaynaklanan düşük mekanik

dirence sahip olması, yapının dışarıdan gelen kuvvetlere karşı bozulma ya da büzülmesine yol açmaktadır. Bir diğer dezavantajı ise biyobozunmasının hızlı olması ve bu nedenle doku tamirinin kısıtlı kalmasıdır [196].

Song ve diğerleri (2014) kitosan, ipek ve hidroksiapatitten oluşan membranı sıçanlarda kalvaryal defektlere uygulamışlardır. Araştırmada, 8. haftaya kadar yapılan histolojik ve mikro-BT incelemelerle, kemik mineral yoğunluğu ile kemik hacmi değerlendirilmiş, sonuçlar kollajen membran ve negatif grupla karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar histolojik incelemede ürettikleri membranın, kollajen membranla aralarında fark bulamazken, bu durumu kollajen membranların osteokondüktif kapasitelerinin yüksek olmasına bağlamışlardır. Ayrıca araştırmacılar kollajenin yara bölgesinde bulunan büyüme faktörlerine (BMP, TGF, FGF faktörlerine) yüksek afinitesi olan ECM proteinlerine bağlanmasının önemini vurgulamışlardır [197].

Sentetik biyobozunan polimerler ise yüksek kimyasal ve mekanik özellikleri, fizyokimyasal karakteristiğinin değiştirilebilir olması (moleküler ağırlığı) gibi avantajlarından dolayı doğal polimerlerden üstündür. Ancak uygulanacak dokunun akut veya kronik iltihabi cevabı ve hidrolitik bozunumu nedeniyle pH'nın düşmesi ile ortamın asidik hale gelmesi dezavantajıdır. Sentetik polimerlerin biyoyumluluklarını artırmak için doğal polimerlerle birlikte kompozitler üretilmekte, bu kompozitlerin yüzey özelliklerinin değiştirilmesiyle hücre üremesine elverişli hale getirilmektedir [165, 198].

Sentetik polimerlerden polilaktik asit (PLA), poli-glikolik asit (PGA) ve kopolimerleri, poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) yaygın olarak kullanılmaktadır. PLA ve PGA biyoyumlu ve toksik değildir. Bu polimerler hücre transplantasyonunda yapay iskele olarak kullanılır ve FDA onaylı pek çok uygulama alanları vardır [165]. Bunlar dışında polikaprolakton [poly( -caprolactone) (PCL)] ve polidioksanon (PDO) doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır [198, 199].

Polikaprolakton (PCL) alifatik bir ester olup kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan ve araştırılan sentetik bir polimerdir. PCL 1930'ların başında Carothers grubu tarafından sentezlenmiştir. PCL'nin sayıca ortalama molekül ağırlığı 3000 ve 80 000 g/mol arasında değişirken, 0,4 GPa mekanik direncine sahip olup 58 ile 63 C arasında eriyebilen biyoyumlu bir polimerdir [200]. Mikroorganizmalar tarafından bozunabilen bu polimer

günümüzde ticari olarak klinik alandaki pek çok üründe kullanılmaya başlanmıştır [201-203].

PCL in vitro ve in vivo çalışmalarda ilaç salım cihazı olarak FDA'dan onay almıştır [200, 204]. Bu cihazlar, antibiyotikler, anti-inflamatuvar ve kanser ilaçların kontrollü salımında kullanılmaktadır [202, 204, 205]. PCL'nin günümüzde ilaç salımında kullanılmasının başlıca sebebi mekanik özelliklerinin iyi olması ile beraber rezorpsiyon sürelerinin uzun sürmesidir. PCL hidrolize edilerek diğer biyobozunabilen polimerlerden daha uzun sürede rezorbe olabildiği ancak PCL'nin moleküler ağırlığının değiştirilmesiyle rezorpsiyon süresinin 3 yıldan 30 aya kadar indirilebileceği rapor edilmiştir [206].

PCL hidrofobik, yarı-kristalize bir polimer olmasına bağlı olarak değiştirilebilir bozunma ve mekanik özelliklerine sahiptir [199, 200]. Kolay şekil verilebilmesi ve dokunun içine ilerlemesi için uygun gözenek genişliğine sahip olması cerrahide yara örtücü, sütür, zımba olarak, jinekolojide hormon replasman tedavilerinde taşıyıcı olarak ve diş hekimliğinde kanal dolgu maddesi (Resilon/Epiphany) olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır [200, 201, 203].

Bu polimer, tetrahidrofur, kloroform, toluen, diklorometan ve benzen gibi birçok çözücü yardımı ile çözülebilmektedir [207]. PCL'nin vücuttaki rezorpsiyonu sonucunda salınan bozunma ürünleri trikarboksilik asit ile böbrek tarafından metabolize edilir [208].

PCL'nin tıbbi doku mühendisliği ürünlerinde kullanımı son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır. Ayrıca, tıpta menisküs tedavilerinde hyaluronik asit veya β -trikalsiyum fosfat ile birleştirilerek oluşturulan iskeleler üzerine yeni çalışmalar yapılmaktadır. Kalp-damar cerrahisinde kapakçık protezlerinde, mitral ve aort kapak replasmanında, mekanik kuvvetlere dirençli olması sebebiyle tercih edilen bir malzemedir. Damar ve sinir cerrahisinde ise stent üretimi için subkutan degradasyona sahip olması ve toksik olmaması nedeniyle pek çok ticari ürün geliştirilmiştir [200].

Kemik doku mühendisliğinde PCL'nin iskele olarak kullanıldığı çalışmalarda, osteoblastların PCL'ye tutunduğu, yayıldığı ve çoğaldığı bulgulanmıştır [209]. Oh ve diğerleri (2007) yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarda PCL iskelelerinin farklı gözenek büyüklüklerinin hücre ve doku etkileşimlerini incelemiş, 380-405 μ m gözenek genişliğinin

kondrosit ve osteoblastların gelişimine, 186-200 µm gözenek genişliğinin ise fibroblastların gelişimine daha uygun olduğunu göstermişlerdir [210]. Son yıllarda periodontal defektlerde de alveolar kemik rejenerasyonunu artırabileceğine dair prelinik çalışmalar yapılmaktadır [211, 212]. PCL'nin ağız içi kemik rejenerasyonunda da kullanılmak üzere çalışmaların devam etmesi beklenmektedir [213].

Elektro-eğirme tekniği ile oluşturulan PCL membranlar, periodontitisin iltihabi durumunu ortadan kaldırmak için metronidazol (MET) benzoat gibi dişeti oluğuna uzun süreli antibiyotik salımı için kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, in vitro metronidazol salımının, fosfat tampon çözeltisinde en az 19 gün devam ettiğini bulgulamış, böylece bu sürenin periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılan metronidazol salımının polikaprolakton nanolifleri aracılığıyla olabileceğini belirtmişlerdir [214].

Benzer bir başka çalışmada ise Reise ve diğerleri (2012) farklı dozlarda MET yüklü PCL membranların periodontopatojenler üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırmada %20 MET içeren PCL membranların, ilk 7 günde MET'in %32-48'ini saldığını ortaya koymuşlardır. %40 MET içeren PCL membranlarda ise MET'in etkisinin *F. nucleatum* ve *P. gingivalis* bakterilerinin canlılıklarını azalttığı, *A. actinomycetemcomitans*'lerin ise 2. güne kadar canlılığının devam edebildiği bulgulanmıştır [215].

Dai ve diğerleri (2004-2009) yaptıkları iki çalışmanın in vitro aşamasında PCL ve kollajen kompozitini doku mühendisliği ürünü olarak deri rejenerasyonu amacıyla üretmişler ve fibroblast ve keratinositlerin PCL'ye tutunmasını ve çoğalmasını göstermişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları in vivo çalışmada ise bu kompoziti sıçanların sırtında deriye yerleştirmişler, 19 gün sonunda yaranın tamamen iyileştiğini, böylece yara iyileşmesinin hızlı olduğunu, kompozit yüzeyinde ise epidermal farklılaşma ve kollajen birikimini göstermişlerdir [146, 216].

Fujihara ve diğerleri (2005) yaptıkları çalışmada nanofibröz PCL ile kemik defektlerinde doldurucu olarak kullanılan kalsiyum karbonatı elektro-eğirme tekniği ile birleştirerek membran oluşturmuşlar ve tek tabakalı PCL membran ile karşılaştırmışlardır. Araştırmada membranın; osteoblast hücre kültürlerinde SEM, EDX ve MTS hücre canlılığı testleri ile YDR uygulamaları için uygunluğunu değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar kalsiyum karbonatın PCL ile tek başına kullanımının özellikle mandibular kemik defektlerinde yüksek

mekanik stres altında deforme olmasından dolayı gerilme direncinin yetersiz kaldığını, membrana PCL çekirdek tabakanın eklenmesinin gerekliliğini belirtmişlerdir [217].

Doku iskelelerinde kullanılan bir diğer materyal de seramiklerdir. Seramik biyouyumluluğunun iyi olması ve osseointegrasyon sağlamasından dolayı doku mühendisliğinde tercih edilmektedir. Ancak mekanik dayanımı ve bozunumunun yetersiz kalması diğer malzemelerle beraber kullanımına neden olmuştur. Seramiklerden olan hidroksiapatitler, kemik hücreleri ile kültüre edildiğinde, osteojenik etkilerinin yüksek, osteokondüktif kısmen de osteoindüktif özellikte olduğu gösterilmiştir [30]. Ancak, hidroksiapatit tek başına kullanıldığında porözitesinin düşük olması ve zayıf dayanımı dezavantajdır. Bu nedenle biyouyumluluğu ve bozunumunun daha iyi olması nedeniyle beta-trikalsiyum fosfat ile beraber kullanılır. Son yapılan çalışmalarda ise her ikisinin de avantajlarından faydalanılmak üzere beta-trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit içeren hibrid materyaller üretilerek ilgili sorunların aşılmasına çalışılmaktadır [218, 219].

Liao ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmada üç tabakalı olarak nano-karbonlu hidroksiapatit, kollajen ve PLGA'dan oluşturdukları kompozit membranı 50 ml'lik yapay tükürükte bekleterek in vitro ortamda biyobozunumunu incelemişlerdir. Araştırmada kompozit membranın sadece PLGA membrana göre daha yavaş, ancak 12. haftaya kadar neredeyse tamamının biyobozunma gerçekleştirdiğini görmüşlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, 4. haftada nano-karbonlu HA tabakanın bozunduğunu ve ortama kalsiyum iyonlarını saldırdığını, bu yüzden periodontal iyileşmede etkili olabileceğini belirtmişlerdir [57].

Vaquette ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmada bifazik bir iskele üretmişlerdir. Araştırmacılar Fused Deposition Modeling (FDM-Eriyik Birikim Modellemesi) ile ürettikleri kemik kısmını, elektro-eğirme ile oluşturulmuş mikrofibröz bir tabaka olan periodontal kısım ile birleştirmişlerdir. Bu oluşturulan iki fazlı doku iskelesine periodontal ligament ile osteoblast hücrelerini ekmişler ve iskeleyi in vitro ve in vivo olarak incelemişlerdir. Yapılan hücre kültürünün 21. gün sonunda osteoblastlar mineralize matriksi oluşturmuş, PDL hücre tabakasında ise üreme devam etmiştir. Hücre ekilen bu iskeleler atimik sıçanlara dentin blokları ile beraber subkütanöz olarak yerleştirilmiş ve iskelelerin 8 haftalık histolojik sonuçları değerlendirilmiştir. Dentin bloklardan alınan Mikro-BT analizlerde osteoblastlarla yüklenmiş iskelelerde, kemik tarafında ALP boyaması daha fazla

gözlenirken, periodontal ligament hücre tabakası ile dentinin arasında ise ince mineralize semente benzer bir doku birikmiştir. İskeleler hücreli ve hücreli olarak karşılaştırıldığında, hücre tabakalarının kullanıldığı iskeleler daha başarılı bulunmuştur. Bunun yanında elde edilen immünohistokimyasal sonuçlarda dentinin üzerinde CEMP1 proteininin varlığı görülmüştür. Bu sonuç PDL ile osteoblast hücre tabakaları ve bifazik iskelelerin kombine kullanımının; alveolar kemik, periodontal ligament ve sementin in vivo olarak rejenerasyonunu sağladığını göstermiştir [52].

Bottino ve diğerleri (2011) yaptıkları çalışmada periodontal rejenerasyon için elektro-eğirme tekniğini kullanarak fonksiyonel iki tabakalı membran elde etmişlerdir. Oluşturulan bu membranın çekirdek tabakası PLCL [poly(CL-laktit-co-ε-kaprolakton)] den oluşturulmuş, her iki tarafı protein içeren polimer ile kaplanmıştır. Araştırmacılar membranın içerisine nHA, diğer yüzeyine periodontal patojenleri elimine etmek için metronidazol ekleyerek kullanılan membranların eksikliklerini gidermeyi hedeflemişlerdir. Bu çalışma sonucunda elektro-eğirme tekniği ile elde edilen nanofiber çekirdek katmanının daha yüksek dayanıma sahip olduğunu, yüzey katmanının ise nano-hidroksiapatit içermesi nedeniyle osteokondüktif aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Bunun yanında, elektro-eğirme tekniği ile elde edilen fiber yapıların; mekanik bütünlük, biyobozunurluk ve hücre-membran etkileşiminde büyük avantaj sağladığını belirtmişlerdir [58].

2.7.3. Doku iskelelerinin üretimi

Doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesinin elde edildiği malzeme kadar tasarımı ve üretimi de önemli bir basamaktır. Çünkü üretilen membran ya da iskelenin uygun gözeneklilik, yeterli mekanik dayanım gibi pek çok fiziksel özellikleri malzemenin fabrikasyon yöntemine göre farklılık göstermektedir. Doğru doku iskelesinin elde edilmesi, biyomalzeme için kullanılacak tekniğin yanında, uygulanan üretim işleminin teknolojik altyapısına ve başarısına bağlıdır.

Doku iskeleleri üretiminde kullanılan geleneksel yöntemleri kısaca sıralayacak olursak; fiber bağlama, elektro-eğirme, çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma, faz ayrımı ve dondurarak kurutmadır. Ancak bu yöntemlerde gözenekliliğin kontrolü, istenilen geometride iskele üretimi her zaman mümkün olamamaktadır. Bu nedenle serbest katı hal yöntemleri adı verilen bilgisayar destekli tasarım (CAD), bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik

rezonans görüntüleme (MRI) verileri aracılığıyla doku iskelesi üretimi yapılabilmektedir. Doku iskelelerinin üretimi katman katman işlenerek mimari ve gözeneklilik açısından kontrol edilebilir duruma gelmiştir. Lazerle kalıplama, birikim modellemesi (fused deposition modeling, FDM) gibi yöntemler buna örnektir [220].

Son yıllarda nanoteknoloji alanında elektro-eğirme tekniği ile nano-liflerin üretimi; ekonomik olması, tekrar edilebilir olması ve üretim kolaylığı nedeniyle yoğun ilgi görmektedir. Elektro-eğirme tekniği gözenekli yapı, düzenli çapta polimer veya seramiklerden nanolif üretimine olanak sağlar [221]. Elektro-eğirme tekniği, iskelenin yapısal özelliklerinin kontrol edilebilmesi ve değişkenlerin yönlendirilmesi ile istenilen özellikte iskele üretimine izin vermesi açısından kullanışlı bir yöntemdir.

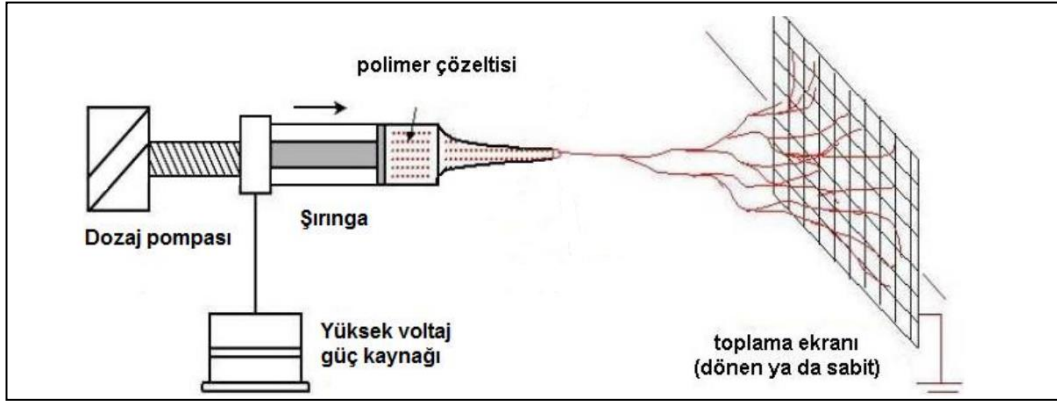
Elektro-eğirme tekniği

Elektro-eğirme tekniği ilk kez Formhal tarafından 1934 yılında geliştirilmiştir. Çözücü çeşidi, konsantrasyonu, iletkenlik ve yüzey gerilimi gibi polimer solüsyonunun özellikleri ile eğirme parametreleri olan akış hızı, toplama uzaklığı değiştirilerek farklı nanolif çapları ve gözeneklilik elde edilebilmektedir [222].

Elektro-eğirme tekniği çok çeşitlidir ve farklı materyallere farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Bu teknik ile 3mm'den küçük boyutlara kadar lif yapıları elde edilebilirken, geniş yüzey alanına ve yüksek poröziteye sahip materyaller oluşturulabilmektedir [222].

Sentetik polimer kullanılan sistemler; polimerin ayarlanabilir mekanik özellikleri, protein kaplama ve biyosinyal moleküllerinin kimyasal yöntemlerle bağlanması gibi uygulamalarla yüzeye özellik katılması yönünden avantajlar sunmaktadır [223].

Elektro-eğirme işleminde, polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulanarak yüklerin sıvı içerisinde uyarılmaları sağlanır. Polimer çözeltisi içerisindeki uyarılan yükler kritik bir değere ulaştığında, şırınganın iğne ucundaki damla koni şekline gelir ve bu sıvı püskürmeye başlar. Sıvı toplayıcının yüzeyine yönlendirilerek bu yüzey üzerinde birikir (Şekil 2.5).



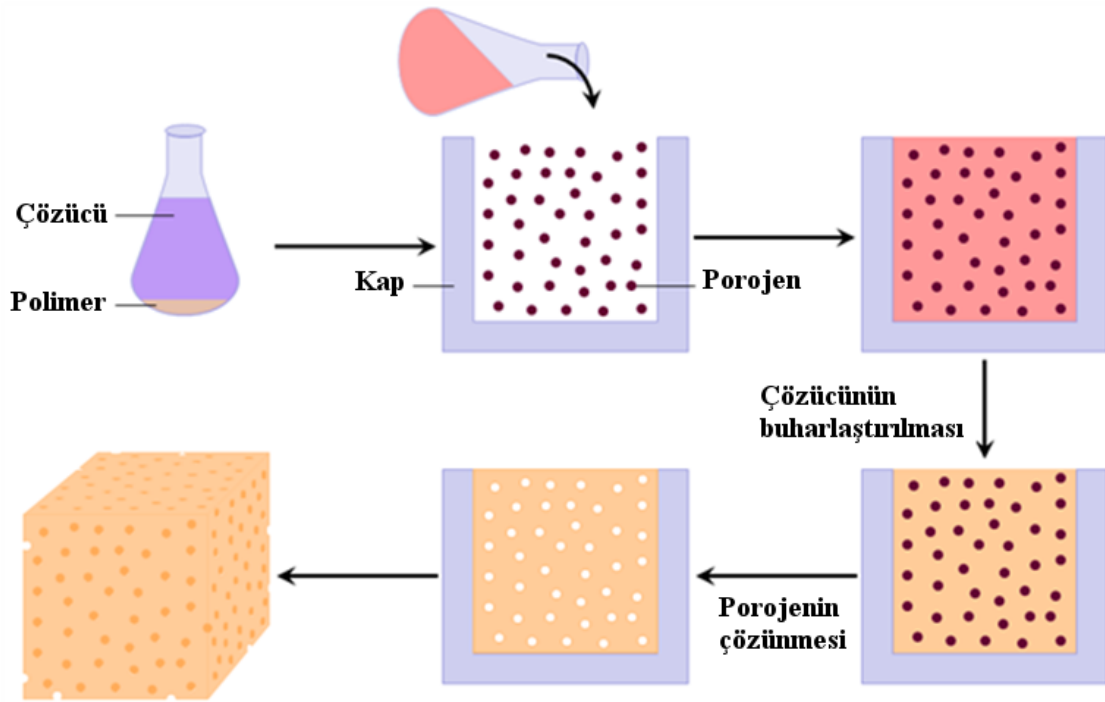
Şekil 2.5. Elektro-eğirme deney düzeneği

İskele materyali üretimi için o dokunun ya da organın üretiminde kullanılacak materyalin özelliklerinin çok iyi bilinmesini gerektirmektedir. Daimi implantlar genellikle kemik, diş gibi sert doku tamirinde kullanılan metal, alaşım ve seramiklerdir. Yumuşak doku tamirinde ise daha çok sentetik ya da biyolojik polimerler kullanılmaktadır [224].

Son 10 yıl içerisinde elektro-eğirme tekniği kullanılarak mikro ve nano boyutlarda liflerin üretilmesi ile ECM yapısını taklit edebilen iskelelerin yapımı mümkün olmuştur. Hücre ile etkileşebilen iskelelerin oluşturulması sonucunda hücrenin farklılaşmasının yönlendirilebilmesi oldukça önemlidir. Klasik iki boyutlu yapılarla düz yüzeylerde gerçekleştirilen hücre kültürlerinin yerine, ECM'nin biyolojik yapısına yakın ve büyüme faktörlerinin içine yerleştirildiği üç boyutlu yapıların hücre tutunmasında, çoğalmasında ve farklılaşmasında daha etkili olduğu pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [223, 225].

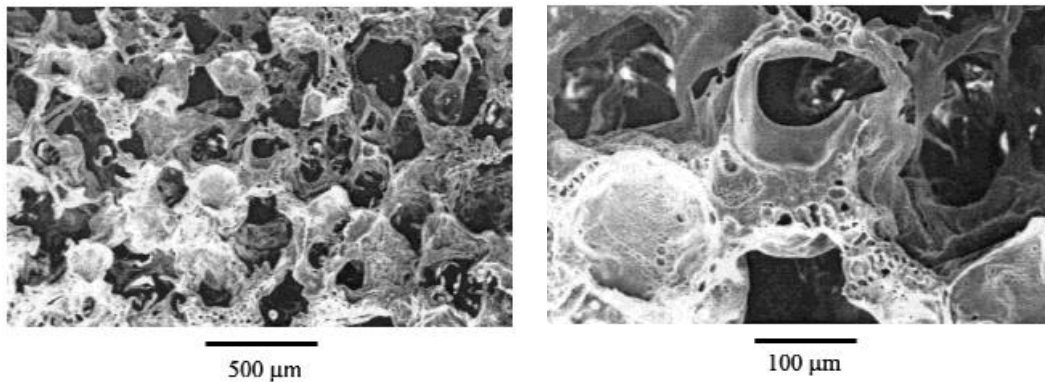
Çözücü buharlaştırma-parçacık uzaklaştırma

Çözücü buharlaştırma-parçacık uzaklaştırma tekniği ile gözenek boyutu ve gözeneklilik özellikleri kontrol edilebilen membran şeklinde doku iskeleleri üretilmektedir. Bu teknikte öncelikle polimer, çözücü içerisinde çözünür. Hazırlanan bu çözeltinin içerisine porojen adı verilen tuz, şeker, jelatin veya parafin gibi katı eriyebilen parçacıklar eklenir. Bu karışım sonrasında düz bir yüzeye aktarılır ve çözücü uzaklaştırılır. Bu şekilde üç boyutlu yapı halinde membran oluşur. Bu yapı herhangi bir çözücüyle karıştırıldığında, içerisindeki porojen yıkanarak yapıdan uzaklaştırılır. Bu sayede membranda gözenekler meydana gelir. Yüksek poroziteli doku iskeleleri %93 oranına kadar çıkabilmektedir ve ortalama gözenek genişliği 500 μm dir [226, 227].



Şekil 2.6. Çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma tekniği

Şekil 2.6' da görüldüğü üzere porojenin geometrisi ve boyutu gözenek yapısına doğrudan yansımaktadır. Doku iskelesinin gözenekliliği porojen/polimer oranıyla ayarlanabilmektedir. Porojen değiştirilerek farklı özelliklerde doku iskeleleri üretilebilmektedir. Bu yöntemin en önemli kısıtlaması ancak 3 mm'ye kadar membran kalınlığı elde edilebilmesidir. Porojen kalıntılarının varlığı ve içyapının kontrol edilememesi membranın üretiminde yaşanan sorunlardandır [226].



Resim 2-1 Çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma yöntemi üretilen PLGA doku iskelelerine ait örnek SEM görüntüleri [228]

Çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma yöntemi üretilen PLGA doku iskelelerine ait örnek SEM görüntüleri [228]

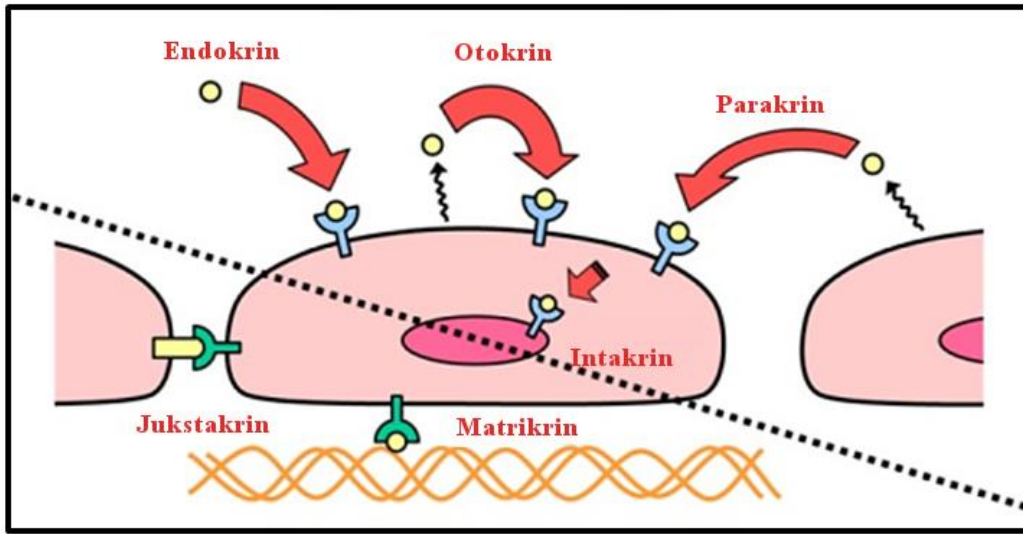
2.8. Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri

Büyüme faktörleri, hücreler görev görürken sistemik ya da lokal olarak etki göstererek hücrelerin çoğalma ve gelişimini sağlayan polipeptitlerdir. Büyüme faktörleri, embriyonik ve doğum sonrası dönemdeki gelişmeyi taklit ederek hasarlı dokuların rejenerasyonunu gerçekleştirirler [61, 229].

Farklılaşma faktörleri prekürsör hücrelerin fenotipini değiştirerek belirli bir hücreye doğru olgunlaşmasını kontrol eder. Örnek olarak farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşmesi verilebilir [229].

Büyüme ve farklılaşma faktörleri hedef hücreye göre sınıflandırılırlar. Bunlar;

- Endokrin : Sinyal molekülleri ya da hormon kan dolaşımına salınır ve vücuttaki hedef hücrelere ulaşır.
- Parakrin : Hücrenin yakın çevresindeki hücreler etkilenir.
- Otokrin : Hedef hücre aynı zamanda büyüme faktörünün salındığı hücrenin kendisidir.
- Jukstakrin : Hedef hücre büyüme faktörü/ reseptör kompleksi ile karşılaşır.
- İntakrin : Büyüme faktörü reseptör kompleksi hücre içine alınır.
- Matrikrin : Hedef hücre ECM parçalandığında ortaya çıkan sitokin ile etkileşir.



Şekil 2.7. Büyüme faktörlerinin etki mekanizmaları [230]

Büyüme faktörleri hedef hücrenin yüzeyindeki özel reseptörlere bağlanarak hücreyi aktif hale getirir. Bunlar, otokrin etki gösterir; hedef hücreler de kendileridir. Ancak daha yaygın olarak büyüme faktörleri parakrin etki gösterir. Herhangi bir hücre tipinden salınan büyüme faktörü, farklı bir hücre tipini etkilerse bu etkiye parakrin etki denir [229, 231].

Büyüme faktörleri hücrel çoğalmayı, farklılaşmayı, migrasyonu ve gen ekspresyonunu ya uyarır ya da inhibe eder. Aynı zamanda özel hücre tiplerinin metabolizmasını; örneğin kollajen gibi ECM'nin üretim hızını kontrol eder [229].

Periodontal dokuların iyileşmesinde rol oynayan ve hücre fonksiyonlarını düzenleyen büyüme faktörleri; kemik, sement ve bağ doku oluşumunu etkilemektedir. Birçok hücrel büyüme faktörü periodontal rejenerasyona etkileri bakımından araştırılmış ve bunlardan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB), kemik morfojenik proteinleri (BMP-2 ve BMP-7), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF-2), büyüme ve farklılaşma faktörü-5 (GDF-5), insülin büyüme faktörü (IGF-I, II) ve mine matris proteinleri (EMD) gibi çeşitli biyolojik ajanların hızlandırıcı etkisinin olduğu saptanmıştır [61, 232, 233].

Günümüzde büyüme faktörlerinin içine yerleştirildiği çeşitli polimerler, hidrojeller, biyoaktif seramikler ve kemik greftleri araştırılmaktadır. YDR tekniğiyle sadece periodontal ligament hücrelerinin bölgede re-popülasyonu sağlanırken, büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi sırasında hücrel aktiviteleri artıracak ya da taklit edecek olayları sağlaması için taşıyıcı ajanların kullanımı araştırma konusu olmaya başlamıştır [191].

Türkiye’de ticari olarak kullanıma sürülmüş olan doku mühendisliği ürünlerinden EMD, domuzdan elde edilen amelogeninleri içeren enjektör içinde visköz kıvamda jel formundadır. EMD’nin periodontal ligament oluşumuna izin veren asellüler sement formasyonunu uyardığı bilinir. 10 yıllık kemik içi defektlerinin değerlendirildiği bir araştırmada EMD, YDR, EMD ile YDR ve flep operasyonları karşılaştırılmış, her üç rejeneratif tedavinin 1-10 yılda klinik ataşman kazancını sağladığı bulgulanmıştır [234]. Ancak, randomize kontrollü deneysel klinik çalışmalardan elde edilen bir derlemede ise araştırmacılar, YDR ile EMD arasında önemli farklılıklar olmadığını belirtmiştir [235].

EMD dışında, ABD’de ticari olarak klinik kullanıma geçen trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-GEM21S®) ve kemik morfojenik protein (BMP-2-Infuse®) in vitro ve in vivo olarak araştırılmaktadır. Bunlar dışında Japonya’da büyük klinik araştırmaları devam eden (Faz III) fibroblast büyüme faktörü (FGF-2)’nin ise periodontal rejenerasyonda etkinliği konusunda pek çok yayın bulunmaktadır [236, 237].

2.9. Kemik Morfojenik Proteinler (BMP)

BMP’ler TGF- β ailesinde yer alırken 30’dan fazla farklı alt gruba ayrılabilir [238]. Bu büyüme faktörleri içerisindeki gen homojenitesine ve protein yapısının benzerliğine göre en az dört farklı alt grupta incelenebilir. Bu alt grupları şu şekilde sınıflandırabiliriz:

1. BMP-2, BMP-4
2. BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b
3. BMP-9, BMP-10
4. BMP-12, BMP-13, BMP-14

Kemik morfojenik proteinlerin dokuda bulunduğu yerler ve kemik ve kıkırdakta aldıkları görevler Çizelge 2.4 ‘te özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Kemik morfojenik proteinlerin bulunduğu yerler ve fonksiyonları

| BMP Çeşitleri | Dokuda bulunduğu yer | Kemik ya da kıkırdaktaki fonksiyonları |
|----------------------|--|---|
| BMP-1 | Kemik, kıkırdak, diş, kas, karaciğer, kalp, testis | TGF- β süper ailesinden değil |
| BMP-2 | Kemik, kıkırdak, diş, böbrek, akciğer | Osteojenik, osteoindüktif, kemik rejenerasyonu ve iyileşmesini başlatıcı, osteoblast farklılaşması, kondrogenez |
| BMP-3 | Kemik, kıkırdak, diş, böbrek, akciğer | BMP inhibitörü, osteogenez inhibitörü, |
| BMP-4 | Kemik, kıkırdak, diş, karaciğer, akciğer, pankreas, uterus, kalp, over, testis | Osteogenez, kondrogenez |
| BMP-5 | Kemik, karaciğer, akciğer, böbrek, pankreas, kalp | Kıkırdak gelişimi |
| BMP-6 | Kıkırdak, eklem, kalp, over, karaciğer, üreter, pankreas, epidermis | Osteojenik, osteoblast farklılaşması, kemik rejenerasyonunu artırma |
| BMP-7 | Kemik, kıkırdak, akciğer, böbrek, sinoviyum, karaciğer, kalp, over, göz, testis, epidermis | Osteogenez |
| BMP-8 | Kemik, over, testis | Osteoindüksiyon, osteogenez, kondrogenez |
| BMP-9 | Karaciğer, merkezi sinir sistemi | Osteojenik farklılaşma, kondrogenez |
| BMP-10 | Kalp | - |
| BMP-11 | Merkezi sinir sistemi | - |
| BMP-12 | Kıkırdak, tendon, merkezi sinir sistemi | Kondrogenez, tendon iyileşmesinde |
| BMP-13 | Kıkırdak, tendon | Tendon iyileşmesinde |
| BMP-14 | Kıkırdak, tendon, göz | Kondrogenez |
| BMP-15 | Over | Oosit gelişiminde |

BMP'lerin fonksiyonel rolünü anlamak, ektopik kemikleşme çalışmalarına dayanır. İlk kez 1965 yılında M.R. Urist'in yayınladığı makalede "otoindüksiyon" terimi ortaya konmuş, demineralize kemik matriksinin heterotopik kemik olmayan bölgelere (intramuskular ya da subkutan) yerleştirildiğinde yeni kemik oluşumunu sağladığı gösterilmiştir. Bu makalede Urist, kemik yenilenmesinden aktif bir protein-matriks topluluğunun sorumlu olduğunu belirtmiştir [239].

Urist ve Strates "kemik morfojenik protein" ve "osteindüksiyon" terimlerini ilk kez 1971 yılında klinik ve bilimsel olarak yayınlamışlardır [109].

Sampath ve Reddi 1981 yılında yapmış oldukları çalışmada ektopik kemikleşmeyi göstermek için ham bir biyoanaliz geliştirmişlerdir. Bu analiz, alkalin fosfataz aktivitesi ve yeni oluşan kemiğin kalsiyum içeriği esas alınarak kullanılan ilk biyoanalizdir [240]. Araştırmacılar, BMP'ler uygun bir taşıyıcı ile implante edildikleri zaman; farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin kemotaksis ile aktive edilerek bu hücrelerin migrasyonlarına ve osteoblastlara farklılaşmalarına, kemik matriksi oluşumu ile depo edilen kemik matriksinin mineralizasyonuna neden olduklarını belirtmişlerdir [241]. Kemik dokudaki BMP'ler MKH, osteoprogenitör hücreler, kondrosit, osteoblast, endotelial hücreler ve ECM'deki trombositlerden kaynağını alırlar.

Doğal BMP'lerin kortikal kemiğin içerisinde az bulunması nedeniyle 80'li ve 90'lı yıllarda BMP'ler rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmeye başlanmıştır [190]. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bugüne kadar izole edilebilen büyüme faktörleri arasında BMP'lerin kırık ve kemik oluşumunu stimüle eden en aktif faktörler olduğu gösterilmiştir.

BMP'ler başlıca iskelet sisteminde modeling, embriyonik gelişim sırasında organogenez, doğum sonrası dönemde vertebralarda osteogenezde rol oynarken, böbrek, göz, sinir sistemi, akciğer, diş, deri ve kalp gibi organların üzerine de etkileri bulunur [242].

2002 yılı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan 2 farklı BMP ürünü medikal marketlerde yerini almıştır. Bu ürünler omurga füzyonu ve uzun kemiklerde kaynamama olgusunda kullanılmak üzere rekombinant insan kemik morfojenik proteini 2 (rhBMP-2; Infuse) ve rekombinant insan kemik morfojenik proteini-7'dir (rhBMP-7; Stryker) [243].

Kemik morfojenik protein-7 (BMP-7)

BMP-7 (osteojenik protein / OP-1) 36 kD'luk bir propeptit yapısındadır [244]. Osteogenez ve kemik hücre farklılaşmasında düzenleyici bir proteindir. TGF- β ailesinin bir üyesi olarak ektopik kemik formasyonunu indükler ve segmenter kemik defektlerinin iyileşmesini uyarır. BMP-7 fetal dönemde kırıktdan sentezlenmeye başlar ve bu sentez erişkin dönemde de devam eder [190]. Pietrzak ve diğerleri (2015) yaptığı çalışmada demineralize kemik matriksinden elde edilen BMP-7 miktarının $24,6 \pm 1,56$ ng/g olduğunu kaydetmişlerdir [245].

BMP-7'nin endokondral kemikleşme sürecindeki rolü öncelikle mezenkimal hücrelerin kemotaksisi ile başlar. Bu hücrelerin fibronektin aracılığıyla matrikse tutunması sağlanır. Sonrasında, hücreler çoğalarak kondroblastlara farklılaşmaya ve kırıktdak oluşumuna neden olur. Kırıktdak mineralizasyonu ve yeni damar oluşumundan sonra kırıktdak dokusunun yerini kemik matriks birikimi alır. Böylece kemik ve kemik iliği oluşumu ile kemikleşme süreci tamamlanır [246].

Bu farklılaşma ve kemikleşme süreci BMP-7'nin kemik farklılaşması yolu ile olur. Osteoblast hücre yüzeyinde tip I, tip II, tip III olmak üzere 3 çeşit reseptör bulunmaktadır. BMP-7 tip I ve tip II transmembran serin/tireonin kinaz reseptörlerine bağlanır [247]. BMP-7 kemik metabolizmasında pek çok sinyalizasyon yollarından BMP/SMAD yoluyla osteojenik rol oynar. BMP-7 ligandları, bu reseptörlerden tip II'ye bağlandıktan sonra tip I reseptörde fosforilizasyon meydana getirir. BMPRI fosforilizasyonu, sitoplazmik proteinleri SMAD 1, 5, 8'in fosforilizasyonunu katalize eder. TGF- β ailesinin diğer üyeleri ise BMP'lerden farklı olarak SMAD 2 veya SMAD 3'ü fosforile ederler. Fosforile olan SMAD'larla beraber SMAD 4 kemik iyileşmesi ve rejenerasyonunu düzenleyen hedef genin transkripsiyonunu sağlamak üzere nukleus içine girer. Kemik metabolizması ve osteoblast farklılaşmasında rol oynayan BMP'ler bu yol ile Runx2 ve Osx genlerinin ekspresyonunu sağlarlar. Böylece farklılaşma tamamlanarak kemik yapımı ilerler [242, 243, 247].

BMP-7'nin osteojenik regülasyondaki etkileri çok iyi bilindiğinden BMP-7 kemik hasarlarında kullanılabilir ilk ticari ürün olarak, hemster over hücrelerinden elde edilerek piyasaya sürülmüştür (OP-1 Implant-Stryker, ABD) [243].

BMP-7 lumber kemik füzyonunda uygulanması amacıyla FDA tarafından 2003 yılında onaylanmıştır. Ancak halen kemik tamir uygulamalarında kullanımı sınırlıdır. Diş hekimliğinde periodontal rejeneratif tedavilerde kullanımı ve periodontal kemik defektlerinde uygulanması için hayvan deneyleri 1996'dan bu yana devam etmektedir. Klinik dişhekimliğinde BMP-7 kullanımı henüz FDA tarafından onaylanmamıştır.

BMP-7'nin hücre çoğalması üzerine etkisine bakılan in vitro çalışmalarda osteoblastlarda zayıf etki gösterdiği bulgulanmıştır [248]. Bunun yanında Lallier ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmada BMP-7'nin periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasında azalma gözlemişler, ALP gibi osteojenik farklılaşma belirteçlerinin arttığını belirtmişlerdir [249]. Hakkı ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada BMP-7'nin sementoblast üzerinde etkisini inceledikleri çalışmada, BMP-7'nin ilk 64 saatte hücrelerin çoğalmasını artırdığını, ancak 80 ve 126 saat sonunda artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermişlerdir [250]. Bu bulgular ile paralel olarak Bozic ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmada BMP-7'nin sementoblastik hücrelerin çoğalması ve mineralizasyonunu sağladığını, tip I kollajeni de indüklediğini göstermişlerdir [251]. Hakkı ve diğerleri (2014) periodontal ligament kök hücrelerinde (PDLSC) yaptıkları çalışmada ise, BMP-6 ve BMP-7'nin hücrelerin proliferasyonunu indüklediğini bulgulamışlardır [252].

Kültüre edilen pre-osteoblastlar ve osteoblastların faz kontrast mikroskopisi incelemelerinde BMP-7'nin mineral nodüller oluşturduğu gösterilmiştir [253, 254]. Aynı şekilde sementoblastlarda da farklılaşmanın ve mineral nodül formasyonunun indüklediği görülmüştür [250, 251]. Hakkı ve diğerleri (2014) BMP-2, BMP-6 ve BMP-7'nin PDLSC osteojenik aktiviteleri üzerine yaptıkları araştırmada ise, BMP-7'nin hücrelerdeki osteojenik gen ekspresyonunu artırdığı ve mineralizasyonu sağladığı bulgulanmıştır [252].

BMP-7'nin periodontal rejenerasyonda etkinliğinin değerlendirildiği ilk hayvan çalışması, 1996 yılında Ripamonti tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, maymunlarda büyük azı dişlerine sınıf II furkasyon defekti açılmış, bu defektler sığır kollajen kemiği ile beraber her bir gramına 100 ve 500 µg rhBMP-7 ekleyerek tedavi edilmiştir. 60. gün sonunda elde ettikleri kesitleri histometrik ve histolojik olarak incelemişlerdir. Histolojik kesitlerde, her iki doz BMP-7'nin dentinde biriken sementoid üzerine mineralizasyon odakları oluşturduğu, yani sementogenezi sağladığı gösterilmiştir. Bunun yanında, yerleştirilen taşıyıcının

etrafında mineralize sement-benzeri bir maddenin oluştuğu ve kök yüzeyinde Sharpey liflerinin sementin içerisine uzandığı gösterilmiştir [255].

Ripamonti ve diğerleri (2001) maymunlarda yaptıkları çalışmada ise, BMP-7'nin etkinliğini tek başına BMP-2 ya da her ikisinin kombine tedavisi ile mandibular 1. molar ve 2. molar dişlerine sınıf II furkasyon defektlerinde karşılaştırmışlardır. 60. gün sonunda alınan kesitlerde, BMP-7 ile tedavi edilmiş defektlerde sementogenezin daha fazla olduğunu bulgulamışlardır. Buna karşın mineralize kemik ve osteoid yapı değerlendirildiğinde, BMP-2'li grubun, tek başına BMP-7'li ya da kombine gruplara göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir [256].

Giannobile ve diğerleri (1998) BMP-7'nin periodontal yara iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada beagle köpeklerinde kritik büyüklükte Sınıf III furkasyon defektleri oluşturmuşlardır. Araştırmacılar, defektlere farklı dozlardaki BMP-7 ile kollajen taşıyıcı uygulayarak, kollajen taşıyıcı ve negatif kontrol gruplarını karşılaştırmışlar, 8 hafta sonra alınan kesitleri histolojik olarak incelemişlerdir. Elde edilen kesitlerde diğer gruplardan farklı olarak ankilozun artmadığını, BMP-7'nin dozdan bağımsız olarak osteogenezi uyardığını ve yeni sement ile yeni ataşmanın oluştuğunu belirtmişlerdir [257].

Ripamonti ve diğerleri (2001) daha önce yaptıkları çalışmalarını derledikleri makalede, doğal BMP-7, rekombinant insan BMP-7'leri, rhTGF- β 1 ve rhTGF- β 2'nin yeni kemik oluşumundaki etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, doğal ya da rhBMP-7'lerin kollajen taşıyıcı ile beraber kritik defektlerde heterotopik kemik oluşumunu sağladığını bulgulamışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda rhTGF- β 1 ve BMP-7'yi kollajen taşıyıcılara ekleyerek, kalvaryal defektlerde ve heterotopik bölgelerde endokondral kemikleşmenin tamamen oluşturduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yapılan bu çalışmada, taşıyıcı olarak kullandıkları hidroksiapatitin geometrik yapısının, iyileşmedeki osteoindüktif etkiyi artırdığı belirtilmiştir [258].

Susin ve diğerleri (2010) köpeklerde yaptıkları çalışmada periimplant defektlerinde rhBMP-7'nin etkinliğini incelemiş, BMP-7'nin doza bağlı olarak osseointegrasyonda ve vertikal augmentasyonda klinik başarı sağladığını göstermişlerdir. Ancak prelinik ve pilot insan çalışmalarında, üst çene kemik defektlerinde kemik greftleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı ortaya konmuştur [259].

Biyolojik ajanların yara bölgesine ulaştıklarında proteolitik emilim nedeniyle hızlı çözünmeleri yüzünden yarılanma ömürleri azalmaktadır. Bu nedenle, osteoblast, sementoblast ve periodontal ligament hücrelerinin bu ajanlara maruz kalma süreleri kısalmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda büyüme faktörlerinin etkisini artırmak amacıyla pek çok farklı yöntemler geliştirilmiştir. Ancak BMP-7'nin lokal olarak daha uzun süre yara bölgesinde kalmasını sağlayan ve BMP-7'yi taşıyan, biyouyumlu, osteokondüktif, biyobozunumu kemik oluşumu ile uyumlu, osteoblast hücre invazyonunu sağlayan, bununla beraber periodontal defektlere uygulandığında epitelin gelişinin engelleyerek membran görevi gören bir iskele kullanımına literatürde rastlanmamıştır.

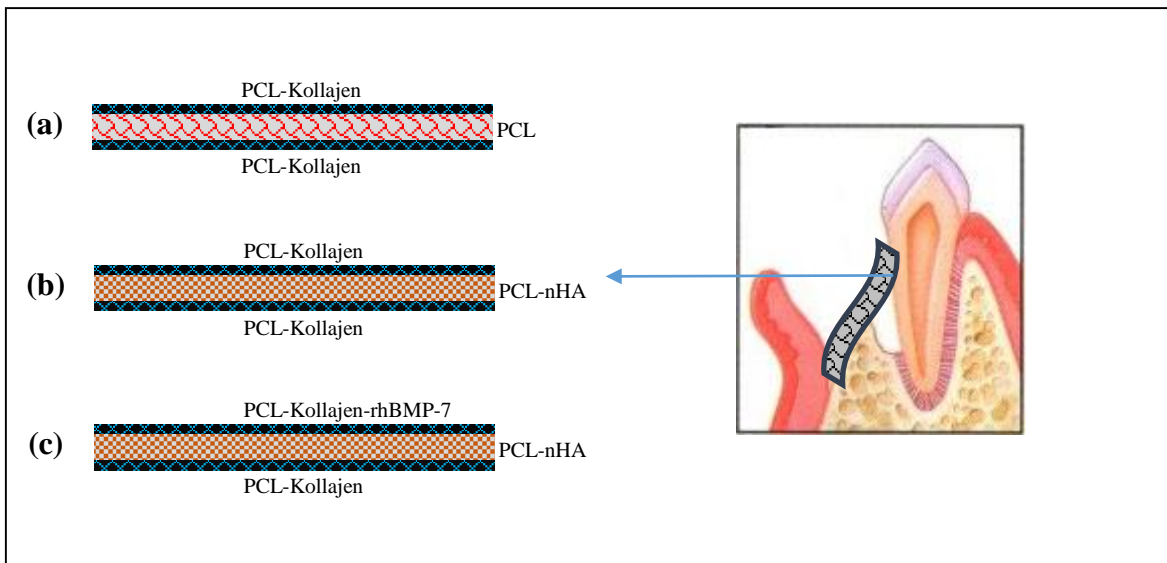
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tasarlanan membranlar Ankara Üniversitesi (AÜ) Fen Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda üretildi. Membranların karakterizasyonu ve hücre ataşmanın değerlendirilmesi için uygulanan SEM ve EDX analizi Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda yapıldı. FTIR-ATR analizleri ve salım çalışmaları AÜ Kimya Mühendisliği Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Membranların in vitro deneyleri öncesinde uygulanan gamma sterilizasyonu Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde (SANAEM) yapıldı. MC3T3-E1 hücreleri Hacettepe Üniversitesi (HÜ) Kimya Mühendisliği Fakültesi'nden temin edilirken; hücre kültürü çalışmaları, MTT, ALP ve gerçek zamanlı RT-qPCR analizleri HÜ Kimya Mühendisliği Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda tamamlandı.

3.1. Prototip Membranların Üretimi

Membranlar farklı malzemeler kullanılarak üç tabakadan oluşturuldu. Üretilen bu membranlar içeriklerine göre aşağıda belirtildiği gibi adlandırıldı.

- a. PCL/ PCL-COL,
- b. PCL-nHA/PCL-COL,
- c. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Membran gruplarının kısıltmalar ile gösterilmesi

Membranların “iskele” adını verdiğimiz orta tabakası yapının bütünlüğünü ve sertliğini sağlamaktadır. Bu iskele tabakası farklı gruplarda polikaprolakton (PCL) (Şekil 3.1 a) ve PCL-nano hidroksiapatitten (nHA) (Şekil 3.1 b,c) üretildi. Tüm gruplarda iskelelerin dışı bakan her iki yüzeyi PCL-kollajen (COL) ile kaplandı. rhBMP-7’li grupta diğer gruplardan farklı olarak membranın kök tarafına gelecek yüzeyine rhBMP-7 eklendi (Şekil 3.1 c).

Birinci gruptaki orta tabakayı oluşturan PCL doku iskelesi $80\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ ağırlığındaki polikaprolakton (ϵ -kaprolakton) (ϵ -CL) (Aldrich, USA) kullanılarak, partikül uzaklaştırma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. İkinci grupta membranın orta tabakası olan iskele, nHA içeren PCL’den partikül uzaklaştırma/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak üretildi.

PCL/COL-PCL ve PCL-nHA/PCL-COL grubunda iskeleler her iki tarafta PCL-COL lifleri ile elektro-eğirme tekniği kullanılarak kaplandı [260]. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grup membranın kök yüzeyine gelecek tarafı ise bu yönteme ilave olarak BMP-7 yüklü PCL-COL lifler ile kaplandı.

3.1.1. Nanohidroksiapatit üretimi

Membranın iskele tabakasında kullanılmak üzere CaPTris yöntemi ile nHA üretildi[261]. Bu yöntemde 24,22 gr Tris tamponu (hydroxymethyl aminomethane) (Sigma, ABD), 6,570 gr hidroklorik asit (HCl) (Merck, Almanya), 1,740 gr potasyumbifosfat (K_2HPO_4) (Merck, Almanya) ve 2,775 gr kalsiyum klorür (CaCl_2) (Sigma, ABD) kullanılarak deiyonize suda 500 mL’lik CaPTris çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin pH’ı 7.4 olarak ayarlandı. Hazırlanan çözeltideki Ca/P oranı 1.67 olacak şekilde CaCl_2 ve K_2HPO_4 karıştırıldı (Çizelge 3.1).

Elde edilen çözelti cam şişelere konularak 37°C sıcaklıktaki inkübatör (Heraus Instruments, Almanya) içinde 24 saat boyunca 200 rpm de karıştırıldı. Bu çözelti, santrifüjleme (MPW-350, High Speed Centrifuge, Polonya) işleminden sonra 5 kez distile su ve 2 kez %100 etanol ile yıkandı. Elde edilen çökelti içerisine 25 mg polietilenglikol 2000 (PEG 2000) (Sigma, ABD) eklendi. Daha sonra elde edilen bu karışım Petri kaplarına alınarak 70°C ’de 12 saat boyunca kurutuldu ve 700°C ’da fırında (Nabertherm, Program Controller s27) 2 saat boyunca sinterlendi.

Çizelge 3.1. CaPTris Yöntemi

| İçerik | Miktar(g) |
|---|-----------|
| Tris((CH ₂ OH) ₃ CNH ₂) | 24,22 |
| HCL | 6,570 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,740 |
| CaCl ₂ | 2,775 |

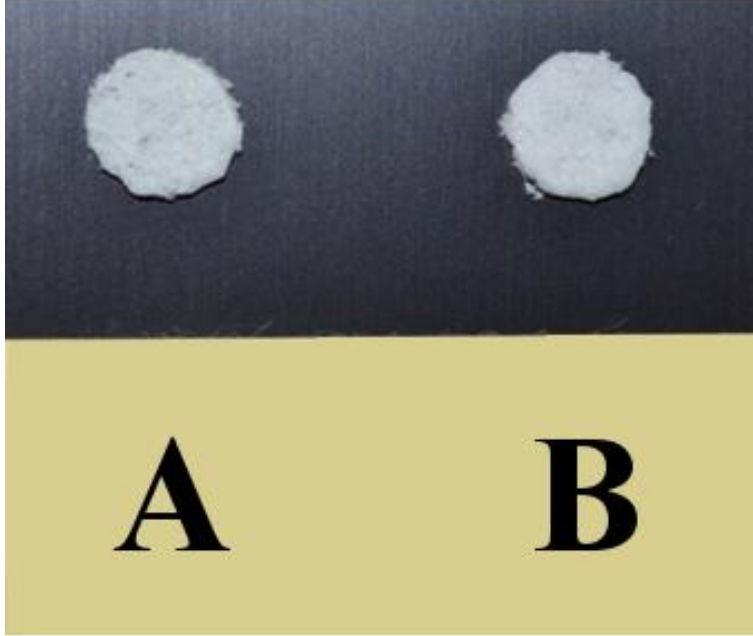
3.1.2. PCL ve PCL-nHA doku iskelesinin partikül uzaklaştırma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi

PCL ve PCL-nHA iskeleleri, partikül uzaklaştırma ve çözücü-buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı [262]. Bu yöntemde göre toz halindeki PCL, %10 (w/v) derişimindeki diklorometan (DCM) (Merck, Almanya) çözücü içinde 12 saat boyunca oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak çözüldü. Birinci grupta iskele üretiminde kullanılan PCL-DCM çözeltilerinden farklı olarak ikinci grupta bu hazırlanan PCL-DCM'ye %1(w/v) oranında nHA ilave edildi. İskelelerin düzenli bir gözenekliliğe sahip olması için %80 oranında 200-300 µm büyüklüğündeki NaCl (5±1µg), PCL-DCM veya PCL-nHA-DCM çözeltilerine eklendi [263]. Çözeltiler kalınlığı 1 mm olacak şekilde çapı 12 mm olan teflon kalıplara döküldü. Kalıplardan çıkarılan iskelelerin içerisinde bulunan DCM çözücüsü kalıpların üstü açık bırakılarak buharlaştırıldı.



Resim 3-1. 2 mm' lik teflon kalıplar

Elde edilen iskeleler 5 gün boyunca deiyonize su içerisinde bekletilerek içeriklerindeki NaCl uzaklaştırıldı. Son aşama olarak iskeleler Petri kaplarında oda sıcaklığında bekletilerek kurutma işlemi uygulandı (Resim 3.1).



Resim 3-2. A: PCL-nHA iskele. B: PCL-COL ile kaplanmış PCL-nHA iskele

3.1.3. PCL ve PCL-nHA membranın PCL/COL ile kaplanması

Elde edilen doku iskelesinin her iki yüzüne, örgüsüz ağ yapısında olan nanofibröz membran, elektro-eğirme tekniği ile kaplandı (Resim 3.3 b) [264]. PCL ve kollajen, 5,5:2,5 (w/w) oranında karıştırıldı. Ardından bu karışım 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Fluka, Birleşmiş Milletler) çözücüsü içinde %8 (w/v) oranında hazırlanarak 2 gün +4°C'de çözüldü.

Resim 3.3' te verilen elektro-eğirme düzeneği üç temel birimden oluşur. İlk birim güç kaynağıdır. İkinci birim PCL/COL-HFIP polimer çözeltisinin bulunduğu enjektördür. Son birim ise metal levha üzerine alüminyum folyo kaplanmış toplayıcıdır. Düzenekte, polimer çözeltisi enjektör pompasının gücü ayarlanarak, tüpün ucundan toplayıcıya doğru püskürtülür. Çözücünün yol boyunca buharlaşmasıyla katılan polimer, örgüsüz nanofibrler halinde toplayıcının üzerinde birikir.

Bu düzenek kullanılarak 1 mL'lik polimer çözeltisi 2mL'lik enjektör yardımıyla 3mL/saat akış hızı, 20 kV voltaj değeri, 10 cm toplayıcı uzaklığı ile doku iskelelerinin üzerine püskürtülerek 4 saat boyunca kaplama işlemi uygulandı (Resim 3.3).

Membranın diğer yüzeyi de ilk tabakanın kaplanmasının ardından aynı yöntemle hazırlandı.



Resim 3-3. a. Elektro-eğirme düzeneği b. Şırınga yardımıyla PCL-COL çözeltinin elektro-eğirme düzeneğinde doku iskelelerine toplanması c. Enjektör (dozaj) pompasının değerlerinin ayarlanması

3.1.4. PCL-nHA iskelenin PCL-COL-BMP-7 ile kaplanması

Toz halindeki 10 μg 'lık rhBMP-7 ile PBS, 1/20 (w/v) oranında karıştırılarak çözelti haline getirildi. 1 mL'lik HFIP çözücüsü içine %8 (w/v) oranında PCL-COL (5,5/2,5) (w/w) karışımı konarak hazırlanan çözelti içerisine 50 $\mu\text{l/ml}$ rhBMP-7 (Merck, Almanya) çözeltisi eklendi. Daha sonra 1 dakika boyunca (pH 7,4) vortekslenerek (Heidolph-Reax-Top-Vortex, Almanya) BMP-7'li membranın dış tabakasının içeriği hazırlandı. Aynı elektro-eğirme

tekniki kullanılarak iskelenin dış tabakası PCL-COL-BMP-7 lifleri ile kaplandı. 3 mL/sa akış hızı, 20 kV voltaj değeri ve 10 cm toplayıcı uzaklığı olarak belirlenen elektro-eğirme koşullarında BMP-7 içeren PCL-COL lifleri elde edildi. Böylece PCL-nHA doku iskelelerinin bir yüzeyi PCL-COL-BMP-7 içeren lifler, diğer yüzeyi PCL/COL lifleriyle kaplanarak membran oluşturuldu.

3.2. Üç Tabakalı Membranın İncelenmesi

İskeleyi oluşturan PCL ve PCL-nHA'nın mikrofiziksel analizi SEM ile PCL-nHA'nın yapısında bulunan nHA'nın yapıya katılımı EDX analizi ile değerlendirildi. Membranın dışına bakan PCL-COL yüzeyi SEM ile incelendi. Kollajenin nanofibröz yapıya katılıp katılmadığı FTIR-ATR spektroskopisi ile değerlendirildi. Membranın kök yüzeyine bakan tarafındaki PCL-COL içinde bulunan BMP-7'nin salımı FITC boyama yöntemi ile izlenerek üç farklı membranın karakterizasyonu yapıldı.

3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji ayırt edici X ışını (Energy Dispersive by X-ray- EDX) analizi

Partikül uzaklaştırma/çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlanan PCL ve PCL-nHA doku iskeleleri, elektro-eğirme tekniği ile kaplanan nanofibröz membranlar, üç tabakalı olarak tamamlanan membranların morfolojik yapıları ve her bir tabakanın yüzey özellikleri SEM (FEI Quanta 200 FEG, ABD) kullanılarak ayrı ayrı incelendi.

Bu amaçla membranlar %2,5 gluteraldehit içeren 0,1 mL Sorrenson fosfat tampon çözeltisi içinde (pH 7,4) 4°C'de tespit edildi. Tespit işleminin ardından membranlar fiksatif ve diğer kirlilikleri uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra, örnekler sulu etanol (%60, %70, %80, %90, %95, %100) serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Petri kabı gibi üstü kapalı bir cama konarak kurutma yapıldı. Daha sonra ince bir altın-paladyum (15 nM) tabakasıyla kaplanan membranlar, SEM cihazında incelenip görüntüldü. SEM cihazında 10, 20 ve 30 kV'luk voltaj değerleri kullanılarak, 200-10 000X aralığında büyütme ile 10-500 µm arasında değişen büyüklüklerde görüntüler elde edildi. SEM görüntülerinden JMicrovision Analiz programı kullanılarak iskeleyi oluşturan gözeneklerin boyutları ve membranın dış tabakasını oluşturan liflerin çapları hesaplandı.

Membranın yapısında bulunan nHA'nın mineral yapısı EDX (X Flash 2001 SDD-EDS dedektörü) analizi ile incelendi. X-ışın inceleme sistemi olan EDX, elektron-madde etkileşimi sonucunda oluşan x-ışınlarını enerji seviyeleri üzerinden iskelede bulunan n-HA'nın yapıya katılıp katılmadığının analiz eden bir cihazdır.

3.2.2. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared-attenuated total reflectance/FTIR-ATR)

FTIR-ATR tekniğinde ışının numune tarafında soğrulup yansıtılması yerine ışının örnekten saçılımı ölçülür. PCL ve PCL/COL membranların yapısında bulunan bağlar hakkında tanımlayıcı bilgiler elde etmek amacıyla, yüzey kimyasal yapıları FTIR-ATR spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 100, ABD) ile 25°C'de 525-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte incelendi.

3.2.3. BMP-7' nin salım analizi

Membranlardan in vitro BMP-7 salımının incelenmesi amacıyla elektro-eğirme işlemi için hazırlanan PCL-COL-BMP-7 çözeltisindeki BMP-7 molekülleri, floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlendi [265]. Öncelikle, 1 ml (Dulbecco) fosfat tampon çözeltisi (PBS) (Hyclane, ABD) içindeki 10 µg/ml rhBMP-7 çözelti haline getirildi. PBS ile 5 µg/ml derişimde hazırlanmış olan FITC'den (Sigma Aldrich, Almanya) 50 µl eklendi. Bu çözelti 8 saat boyunca +4°C'de karanlık ortamda karıştırıldı. Ardından diyaliz membran (Biotech, ABD) içerisine yerleştirilen karışım içi su dolu behere alınarak 48 saat süreyle +4°C'de karanlık ortamda bekletildi. Sonrasında diyaliz membran içerisinden alınan çözelti karanlıkta 24 saat freeze dryer (CHRIST Alpha 2-4 Ld Plus, Birleşik Krallık) ile liyofilize (dondurup-kurutma) edilerek BMP-7 molekülleri hazırlandı. FITC ile işaretlenmiş BMP-7 molekülleri içeren PCL-COL-BMP-7 nanofibröz membran elektro-eğirme tekniği kullanılarak üretildi.

Üç tabakalı olarak hazırlanan membranların her biri 2 mL PBS (pH:7,4) içeren kaba 100 rpm karıştırma hızındaki çalkalama cihazı (Thermoshaker) (Gerhardt, Almanya) yardımıyla 37°C'de inkübe edildi. 1., 2., 4., 6., 24., 48., ve 72. saatlerde 500 µl PBS ortamdaki uzaklaştırılarak UV spektrofotometresinde (Cary 100, ABD) 495 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ortamdaki uzaklaştırılan PBS miktarı taze PBS ile tamamlandı. UV-VIS

spektrofotometreden okunan absorbans değerleri kullanılarak bir kalibrasyon grafiği yardımıyla salınan BMP-7 miktarı kümülatif olarak belirlendi.

3.3. Membranın Sterilizasyonu - Gamma Radyasyonu

Tıbbi sterilizasyonda sterilizasyon dozu 25 kGy olarak kabul edilir [266]. Polikaprolakton bazlı iskelelerde ise uygun sterilizasyon dozunun 25 kGy olduğu gösterilmiştir [267]. Cobalt 60 (⁶⁰Co) atomu ile oluşturulan Gamma radyasyonunun tamamen kapalı olarak paketlenmiş malzemelerin içerisine girebildiği belirtilmiştir [268]. Çalışmamızda üretilen membranlar otoklav paketleme cihazlarında (Sirona, Berlin) paketlenerek hücre kültüründe kullanmadan önce sterilizasyona hazır hale getirildi (Resim 3.4). Gamma radyasyonu için izelge 3.2'deki değerler kullanıldı (Bkz. Ek -1).

Çizelge 3.2. Sterilizasyon koşulları

| | Absorbans/Kalınlık | Doz (kGy) | Sıcaklık (°C) | Nem |
|--------------------------------|--------------------|-----------|---------------|-------|
| Sterilizasyon değerleri | 756/272 | 25 | 25 | %38,7 |



Resim 3-4. Tıbbi sterilizasyon amacıyla paketlenen membranlar ve Gamma Radyasyon Odası (TAEK)

3.4. Hücre Kültürü alışmaları

MC3T3-E1 pre-osteoblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları ile membranın biyoyumluluğu değerlendirildi. Hücrelerin membran üzerindeki canlılığı ve yayılmaları MTT analizi, hücrelerin membran üzerindeki mineralizasyonu ALP analizi ve

osteojenik belirteçlerden olan tip I kollajen, osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN), Runx2 ise RT-PCR analizi ile belirlendi.

3.4.1. MC3T3-E1 hücrelerinin ekilmesi ve çoğaltılması

Ürettiğimiz membranların biyolojik uyumluluğunun araştırılması için fibroblast benzeri, osteoblasta farklılaşan MC3T3-E1 hücre hattı kullanıldı. Embriyonik fare kafatasından elde edilmiş olan bu hücre hattı Riken hücre bankasından (Tsukuba, Japonya) alındı [269]. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS) (Lonza, İsviçre) ve %1 penisilin-streptomisin içeren Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) (Lonza, İsviçre) besi ortamında 37°C’de, %95-98 nem, %5 CO₂ ve %95 hava içeriğine sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) kültüre edildi. Yüzeğe-bağımlı olarak üreyen MC3T3-E1 hücre hattı 14. pasaj hücreleri kullanılarak tek katlı kültürler ile çoğaltıldı.

Hücrelerin Petri kabının yüzeyini tamamen kaplamasının ardından, tripsin/EDTA (%0,01 tripsin/10 μ l EDTA) (Hyclane, ABD) aracılığı ile yüzeyden serbestleştirilen hücreler toplandı. Bu işlemden sonra tripsinin zarar vermemesi için hücreler FBS içeren α -MEM ile yıkandı. Her biri 1,5 cm çapa sahip 24-gözlü polistiren (TCPS) hücre kültür kaplarında (Orange Scientific, Belçika) kültüre edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 5 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüjlendi ve hücre yoğunluğu 4,64 x 10⁴ hücre/mL olacak şekilde hazırlandı.

Hücre kültürü içerikleri PCL/COL-PCL, PCL-nHA/COL-PCL ve PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 olan üç farklı membrana ekildi (Resim 3.5). Her bir membrana 160 μ l hücre ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin yüzeye yapışmaları için 2 saat beklendi. Hücreler ekildikten sonra osteoblasta farklılaşmayı sağlayacak ortam ile kültüre devam edildi. %10 FBS ve %1 penisilin–streptomisin (Biological Industries, Ashrat, İsrail), α -MEM’e 10 nM β -gliserol fosfat (Sigma, Almanya), 50 μ g/mL askorbik asit (Sigma, Almanya) eklenerek farklılaşma ortamı hazırlandı. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan membranlar (çap: 12 mm, yükseklik: 1 mm) farklılaşma ortamı varlığında kültüre edildi. Kültür ortamı, ½ oranında taze farklılaşma ortamı ile üç günde bir yenilendi. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminer akış kabinde (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirildi.



Resim 3-5. Laminer akış kabininde membranların kültür ortamına hazırlanması

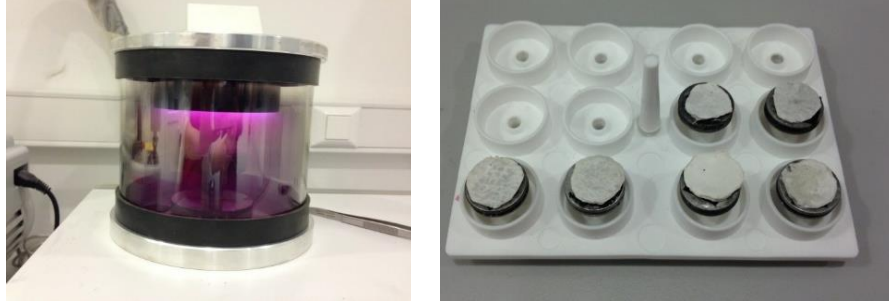
3.4.2. Hücre canlılığı testleri [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi]

MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri ve çoğalmalarının tayini için 1., 3., 5., 7., 14. ve 21. günlerde MTT analizi yapıldı [270]. MTT çözeltisi (2.5 mg/ml, PBS içinde) varlığında canlı hücrelerin mitokondrisi mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Bu kristallerin çözünmesiyle elde edilen çözelti içindeki yoğunluk miktarı hücre canlılığı ile doğru orantılıdır. Her bir gözde bulunan hücreler üzerindeki kültür ortamı ve membranlar uzaklaştırıldıktan sonra 60 µl MTT çözeltisi içeren 600 µl serumsuz besi ortamı eklendi. Hücreler 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edildi, sonrasında membranların içerisinde bulunduğu ortam uzaklaştırıldı. Formazan kristallerini çözmek için her bir göze 400 µl 0.04M HCl (Merck, Almanya) içeren izopropanol (Aklar Kimya, Türkiye) çözeltisi eklendi. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µl alınarak 96 gözlü mikroplate'de, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikroplate okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile optik yoğunluğu ölçüldü.

3.4.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Kültüre edilen hücrelerin membranlar içerisindeki morfolojilerinin görüntülenmesi için kültürün 4., 7. ve 14. günlerinde SEM (QUANTA 400F Field Emission, Hollanda) analizi yapıldı. Örneklerin hazırlanması için önce membranlar üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldı ve daha sonra membranlar iki kez PBS (pH=7.4) ile yıkandı. Yıkanan membranların fiksasyonu için oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk boyunca 1 mL % 2.5'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi kullanıldı ve fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler analize kadar PBS içinde 4°C'de bekletildi. SEM analizinden önce, membranlar PBS ile yıkandı ve sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra membranlar heksametildisilazan (HMDS)

(Sigma, Almanya) içerisinde 5 dk bekletildi. Oda sıcaklığında kurutulanan membranlar altın-paladyum (15 nM) ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alındı (Resim 3.6). SEM cihazında 500X-40000X aralığında büyütme yapılarak 20 kV voltajında 5 µm ile 200 µm arasında değişen büyüklüklerde görüntüler elde edildi.



Resim 3-6. Membranların altın paladyum ile kaplandıktan sonra görüntülenmek üzere SEM için hazırlanması

3.4.4. Alkalen fosfat (ALP) analizi

MC3T3-E1 pre-osteoblast hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını belirlemek için alkalen fosfat (ALP) analizi yapıldı [271]. Hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. gününde membranların üzerindeki besi ortamı uzaklaştırıldı ve membranlar başka bir kültür kabına aktarılarak analiz yapılmaya kadar -80°C 'de bekletildi. Membranlar liyofilizatörde kurutulduktan sonra parçalandı ve Ependorf tüplerine alındı. Örnekler 250 µL Triton X-100 (Sigma, Almanya) çözeltisi (PBS içinde %0.01'lik (v/v) çözelti) içerisinde, 4°C 'de 30 dk inkübe edildikten sonra 4°C 'de, 12,000 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüjlendi. Bu şekilde elde edilen Triton çözeltisinden 50 µL alınarak, 125 µL ALP çözeltisine (56 mM 2-amino 2-metil-1,3-propanol (Aldrich, Almanya) ve 1 mM magnezyum klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Almanya) içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat (pNPP) eklendi ve 37°C 'de 30 dk boyunca inkübe edildi. Gerçekleşen tepkime, her bir örneğe 50 µL 2.5 M sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya) çözeltisi eklenerek durduruldu. Mikroplaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) kullanılarak, 405 nm dalga boyunda pNPP'nin absorbansı ölçüldü.

3.4.5. Hücrelerin osteojenik aktivitelerinin tayini: [Gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu-Real time quantitative reverse transcription polimerase chain reaction (RT-qPCR)]

Dokudaki RNA molekülü PCR ile çoğaltılmadığından PCR aşamasından önce RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından elde edilen DNA, PCR ile çoğaltılır. Bu sentez aşaması gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu RT-PCR olarak adlandırılır. RT-PCR, DNA'nın çoğalması ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Real time qRT-PCR'in aşamaları

Real time RT-qPCR'in aşamaları

Membranlar üzerinde preosteoblastik hücrelerin osteojenik özelliklerini tespit etmek amacıyla tip I kollajen, osteokalsin, osteopontin ve Runx2 ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) Light Cycler Nano sistemi (Roche, İsviçre) ile belirlendi.

Hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. günlerinde membranların üzerindeki besi ortamı uzaklaştırıldı ve membranlar başka bir kültür kabına aktarılarak -80°C 'de analiz yapılmaya kadar bekletildi.

RNA izolasyonu

7., 14. ve 21. günlerde üç farklı membran grubuna ekilen hücrelerden (Hücre yoğunluğu $4,64 \times 10^4$ hücre/mL) RNA izole etmek amacıyla RNeasy MiniKit (Qiagen, ABD) ve Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, ABD) kullanıldı [272].

Membranlar kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde besi ortamından uzaklaştırıldı ve sıvı azot kullanılarak donduruldu. Daha sonra membranlar DNAase ve RNAase içermeyen mikrotüplere alınarak steril iğne ile parçalandı.

Oluşturulan bu örneklerden RNA izole edileceği zaman her bir mikrotüpe 500 µL ve Qiazol Lysis Reagent eklenerek 25-30s vortekslendi ve +4°C'de 2sa bekletildi. Daha sonra örneklere 200 µL kloroform eklenerek 15s aşağı yukarı çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler, +4°C'de 15dk 12,000 g'de santrifüj edildi.

Üstte toplanan sulu RNA fazı yeni bir Eppendorf tüpe aktarılarak üzerine eşit miktarda %70 etanol çözeltisi eklendi. Etanol ile karıştırılan sulu RNA fazı RNeasy spin kolona aktarıldı ve 13,000 rpm'de 15s santrifüj edildi. Bu aşamada elde edilecek RNA'daki DNA kontaminasyonunu azaltmak için Qiagen RNase Free DNase Set kullanılarak kolon üzerinde DNase uygulaması yapıldı.

Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırılarak kolon üzerine 350 µL RW1 (guanidin tiyosiyonat içeren tampon çözeltisi) eklendi. 13,000 rpm'de 15s santrifüj edildikten sonra tüpte toplanan sıvı yeniden uzaklaştırıldı. Her bir örnek için 10 µL DNase stok solüsyonu 70 µL RDD çözeltisi (tampon çözelti) ile karıştırılarak hazırlanan karışım doğrudan spin kolon membran üzerine gelecek şekilde bırakılarak 20-30°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 350 µL RW1 çözeltisi spin kolona eklenerek 13,000 rpm'de 15s santrifüj edildi. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra spin kolona 500 µL RPE çözeltisi (yıkama çözeltisi) eklenerek 13,000 rpm'de 15s santrifüj edildi. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırıldı ve spin kolona tekrar 500 µL RPE çözeltisi eklenerek 13,000 rpm'de 15s santrifüjlendi.

Bu aşamadan sonra spin kolonda yıkama çözeltisinin tamamen uzaklaştırılması için toplama tüpü atılıp yenisi kullanıldı ve 13,000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Daha sonra kolonlar 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine yerleştirilerek membran üzerine en az 30 µL olacak şekilde beklenen RNA miktarına bağlı olarak, RNase-DNase içermeyen steril su eklenerek 13,000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon membranında tutunan RNA, su ile birlikte membrandan çekilerek santrifüj tüpünde toplandı. Santrifüj tüpünde toplanan bu pellet, RT-PCR için kullanılacak saf RNA izolatıdır.

cDNA Sentezi

İzole edilmiş olan RNA'lar -80°C 'de muhafaza edildi. Üreticinin talimatları izlenerek High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ABD) ile c-DNA sentezi gerçekleştirildi [272].

a. 2 Reverse Transkripsiyon Master Miksin hazırlanması

cDNA'nın hazırlanmasında öncelikle Master Miksin içerisine belirli miktarlarda ters transkripsiyon tamponu, deoksiriboz nükleozit trifosfat (dNTP), random primerleri, Multiscribe ters transkriptaz enzimi ve nükleaz içermeyen su karıştırılarak her bir reaksiyon için 10 μL 'lik karışımlar hazırlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Karışımın hazırlanması

| İçerik | Hacim/Reaksiyon (μL) |
|---|---|
| 10 \times Reverse Transkripsiyon Buffer | 2,0 |
| 25 \times dNTP Mix (100 mM) | 0,8 |
| 10 \times RT Random Primerleri | 2,0 |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1,0 |
| Nükleaz içermeyen H ₂ O | 4,2 |
| Reaksiyon başına | 10 |

b. cDNA Reverse Transkripsiyon Reaksiyonlarının Hazırlanması

1. 10 μL of 2 \times RT master mix PCR tüplerin içinde pipetlenir.
2. 10 μL of RNA örneği her bir göze konarak pipetleme yapılır.
3. Tüpler kapatılarak santrifüj edilir.
4. Termal cyclera kadar mutlaka buzda bekletilir.

c. Ters Transkripsiyonun yürütülmesi

Santrifüj edilmiş olan master miks ve RNA örneğinin c-DNA'ya dönüştürülmesi için gereken son aşama olan LightCycler NanoInstrument (Roche, Almanya) basamakları Çizelge 3.4'te belirtildi.

Çizelge 3.4. Hazırlanan karışımın c-DNA haline getirilmesi

| | 1.basamak | 2. basamak | 3. basamak | 4. basamak |
|--|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Sıcaklık($^{\circ}\text{C}$) | 25 | 37 | 85 | 4 |
| Zaman | 10 dk | 120 dk | 5 dk | ∞ |

Reverse Transcriptase qPCR Analizi

5 HotFirePol EvaGreen qPCRMixPlus kiti (SolisBioDyne, Estonya) kullanılarak LightCycler NanoInstrument cihazında üreticinin talimatları doğrultusunda yürütüldü [272]. “Housekeeping gen” olarak kullanılan β -aktin, tip I kollajen, osteokalsin, osteopontin ve run x2 genlerinin primer dizileri (Motek, Türkiye) Çizelge 3.5’te verilmektedir. Bu primerlerin tasarımı ve sentezlenmesi HÜ Biyoteknoloji Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verildi. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre hesaplandı [273]. Membran üzerindeki hücrelerin ilgili gen ekspresyon seviyeleri baz alınarak, diğer gruplar da bunun katları şeklinde değerlendirildi.

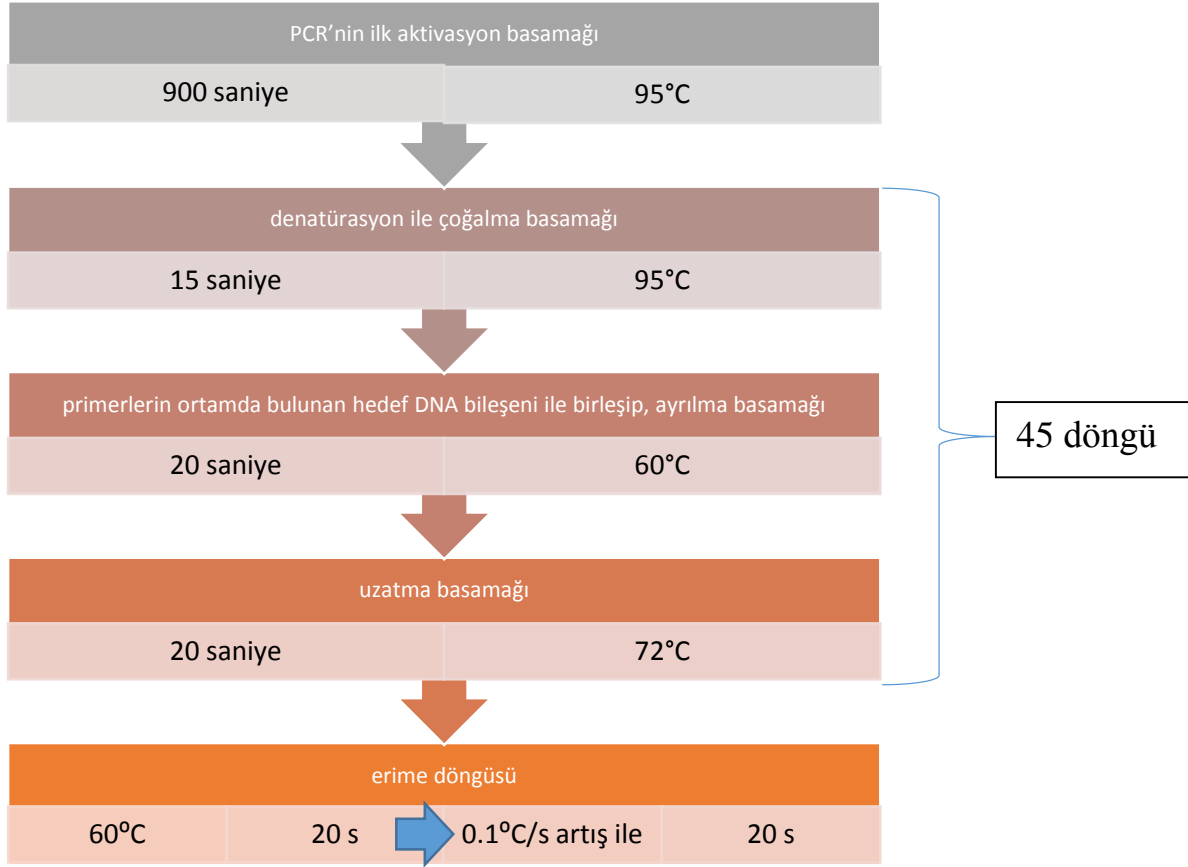
Çizelge 3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri

| | |
|----------------|-------------------------------|
| β -aktin | Forward primer |
| | 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3' |
| | Reverse primer |
| | 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3' |
| Kollajen I | Forward primer |
| | 5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3' |
| | Reverse primer |
| | 5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3' |
| Osteokalsin | Forward primer |
| | 5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG -3' |
| | Reverse primer |
| | 5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3' |
| Run X2 | Forward primer |
| | 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC -3' |
| | Reverse primer |
| | 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC -3' |
| Osteopontin | Forward primer |
| | 5'-CACTTTCCTCCAATCGTCCCTAC-3' |
| | Reverse primer |
| | 5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3' |

Çizelge 3.6. qPCR'in son aşaması için hazırlanan örneklerin dağılımı

| İçerik | μl |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Eva green | 4 |
| Primer forward | 0,3 |
| Primer reverse | 0,3 |
| PCR için hazırlanmış H ₂ O | 12,4 |
| cDNA | 3 |
| Toplam | 20 |

Her bir örnek için üreticinin talimatlarında hazırlanan 20 μ l'lik örnekler (Çizelge 3.6) 95°C'de 15 dk'da PCR'ın ilk aktivasyon basamağı olarak yürütüldü. 45 döngüde denatürasyon ile çoğalma basamağı 95°C'de 15 s'de, primerlerin ortamda bulunan hedef DNA bileşeni ile birleşerek ayrılma basamağı 60°C'de 20 s'de ve uzatma basamağı ise 72°C'de 20 s'de meydana geldi. Son olarak 60°C'de 20 s ve 95°C'de 0.1°C/s artışla 20 s olacak şekilde erime döngüsü uygulandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PCR'nin Light Cycler Nano cihazında yürütülen programı

3.4.6. İstatistiksel analiz

MTT ile belirlenen mitokondrileri gösteren kristallerin yoğunluğu, membrandaki alkalen fosfataz (ALP) içeriği, membranlardan tip I kollajen, osteokalsin, osteopontin ve Runx2 ekspresyonları istatistiksel açıdan GraphPad Instant yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Veriler üç deney için ortalama \pm standart sapma değerleri ile belirtildi. Farklı deney gruplarında istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Üç Farklı Membranın Karakterizasyonu

PCL/PCL-COL, PCL-nHA/PCL-COL ve PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 olarak adlandırdığımız membranların incelenmesi ve hücrelerin tutunmasının değerlendirilmesi için SEM görüntüleri ve EDX analizi kullanıldı. PCL-COL tabakasında bulunan kollajenin membran içerisinde varlığı FTIR-ATR spektroskopisi ile analiz edildi. BMP-7 salım çalışmaları FITC ile boyanarak UV spektrofotometresinde hesaplandı. MC3T3-E1 hücrelerinin membrana tutunmaları, çoğalmaları ve farklılaşmaları; MTT, ALP ve RT-qPCR (Runx2, osteokalsin, osteopontin ve tip I kollajen) analizlerinde incelendi.

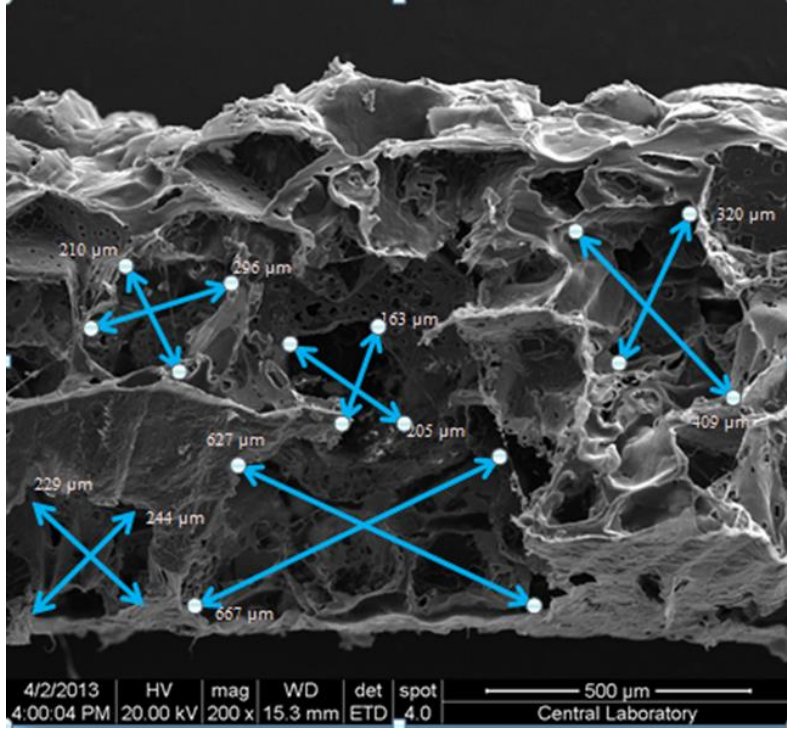
4.1.1. PCL ve PCL-nHA doku iskelelerinin karakterizasyonu

Kemik oluşumuna destek vermek üzere geliştirilen PCL ve PCL-nHA içeren orta tabaka, partikül uzaklaştırma/çözelti buharlaştırma yöntemi ile üretildi.

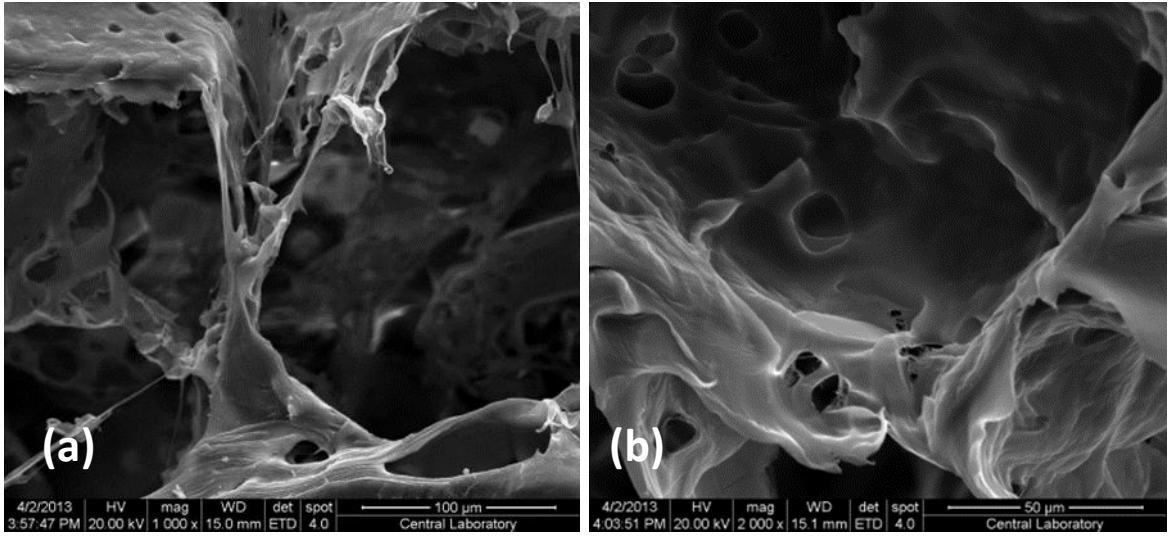
Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi ile PCL ve PCL-nHA doku iskelelerinin analizi

Partikül uzaklaştırma/çözelti buharlaştırma yönteminde gözenekli yapıların elde edilebilmesi amacıyla porojen görevi gören partiküller kullanılır ve sonrasında yıkama ve çözeltinin buharlaştırılması işlemi ile porojen yapıdan uzaklaştırılır. Yapılan çalışmada NaCl partiküllerinden yararlanılarak membranın iskele tabakasının porozitesi sağlandı.

SEM görüntüleri kullanılarak JMicrovision Analiz programı (İsviçre) ile gözenek boyut ve dağılım testleri yapıldı. SEM görüntülerinde partikül uzaklaştırma/çözücü yöntemi ile oluşturulan içsel bağlantıları bulunan porojen bir yapının oluştuğu görüldü. Bu PCL yapıdaki gözenekliliğinin 163-667 aralığına sahip ortalama olarak $337 \pm 172 \mu\text{m}$ olduğu gözlemlendi (Resim 4.1-4.2).

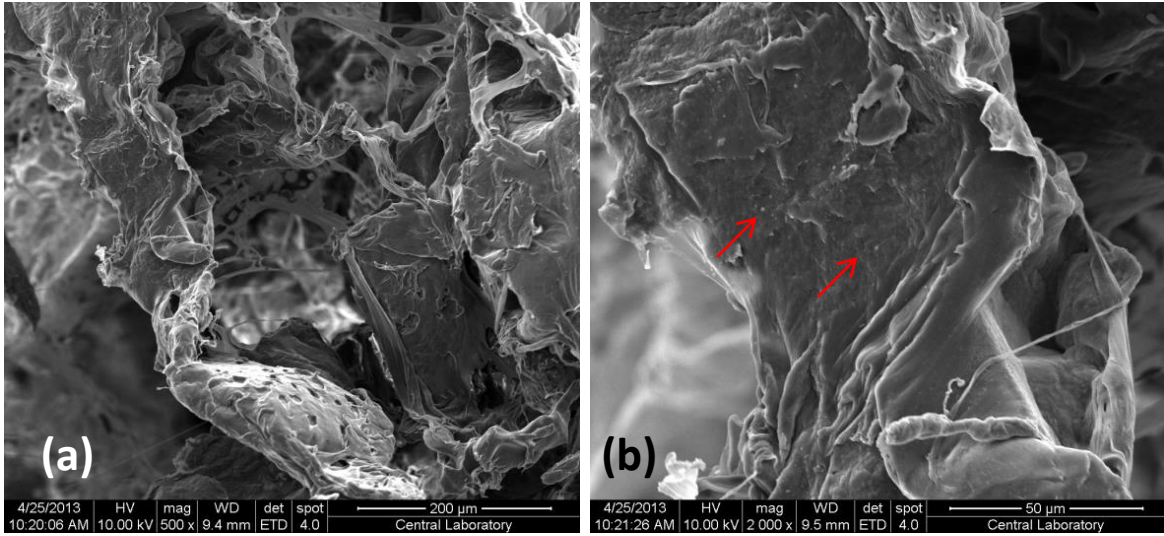


Resim 4-1. PCL iskeletin SEM görüntüsünün hesaplanması: 200X.



Resim 4-2. PCL doku iskelelerinin farklı büyütmelerde çekilen SEM görüntüleri:
(a) 1000X, (b) 2000X.

PCL-nHA iskelesinin üretim aşamasında nHA partiküller PCL çözeltisine eklendi. Oluşan nano boyutlu hidroksiapatit parçacıkları SEM görüntülerinde net bir şekilde gözlemlendi (Resim 4.3 a,b).

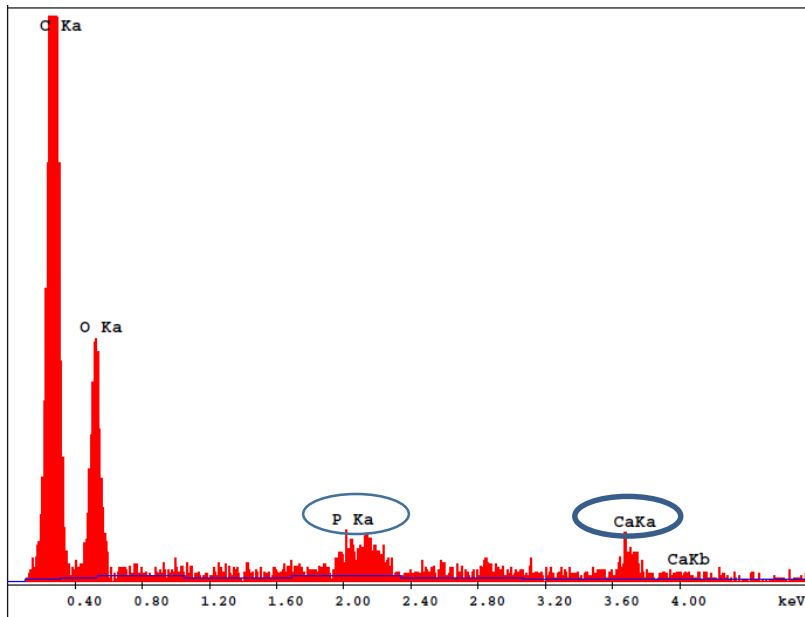


Resim 4-3. PCL-nHA iskele görünümü: (a) 500X, nHA'lar iskelenin içinde görüntülenmektedir: (b) 2000X.

JMicrovision Analiz programında SEM görüntüleri kullanılarak nHA nano yapıları 541 ± 162 nm olarak hesaplandı.

PCL-nHA iskeledeki nHA yapının EDX analizi ile incelenmesi

nHA partiküllerinin yapıya katılımını göstermek amacıyla EDX analizi gerçekleştirildi. EDX ile ilgili sonuçlar Şekil 4.1'de sunuldu.



Şekil 4.1. nHA partiküllerinin yapıya katılımının gösterilmesi

Kalsiyum/ fosfat oranı: $2,16/1,21= 1,78$ oranında nanohidroksiapatit oluşturacak düzeyde hesaplaması Çizelge 4.1' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Membranın içerisindeki elementlerin ağırlıkları

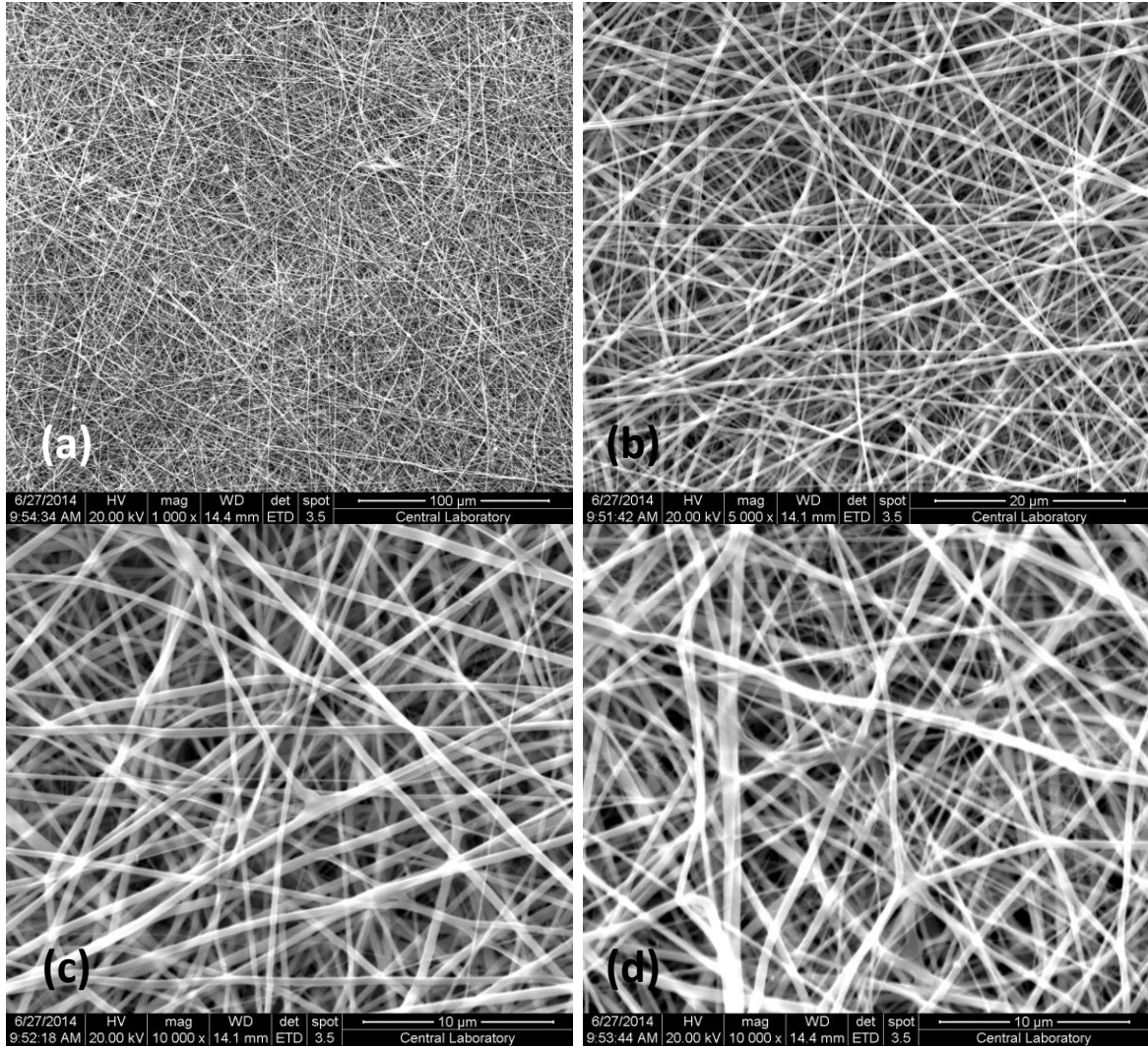
| Element | %Ağırlık | %Atom | K-Oranı |
|----------|----------|-------|---------|
| Karbon | 69,41 | 78,43 | 0,5177 |
| Oksijen | 21,45 | 18,2 | 0,073 |
| Fosfat | 2,77 | 1,21 | 0,0246 |
| Kalsiyum | 6,37 | 2,16 | 0,0572 |
| Toplam | 100 | 100 | |

4.1.2. PCL-COL ve PCL-COL-BMP-7 nanofibröz membranların karakterizasyonu

PCL-COL nanofibröz membranın SEM ile karakterizasyonu

Membranlar bir grupta PCL-nHA doku iskelelerinin her iki yüzeyine PCL-COL lifleri (Resim 4.4), diğer grupta ise bir yüzüne PCL-COL, diğer yüzüne PCL-COL-BMP-7 lifleri ile kaplanarak hazırlandı.

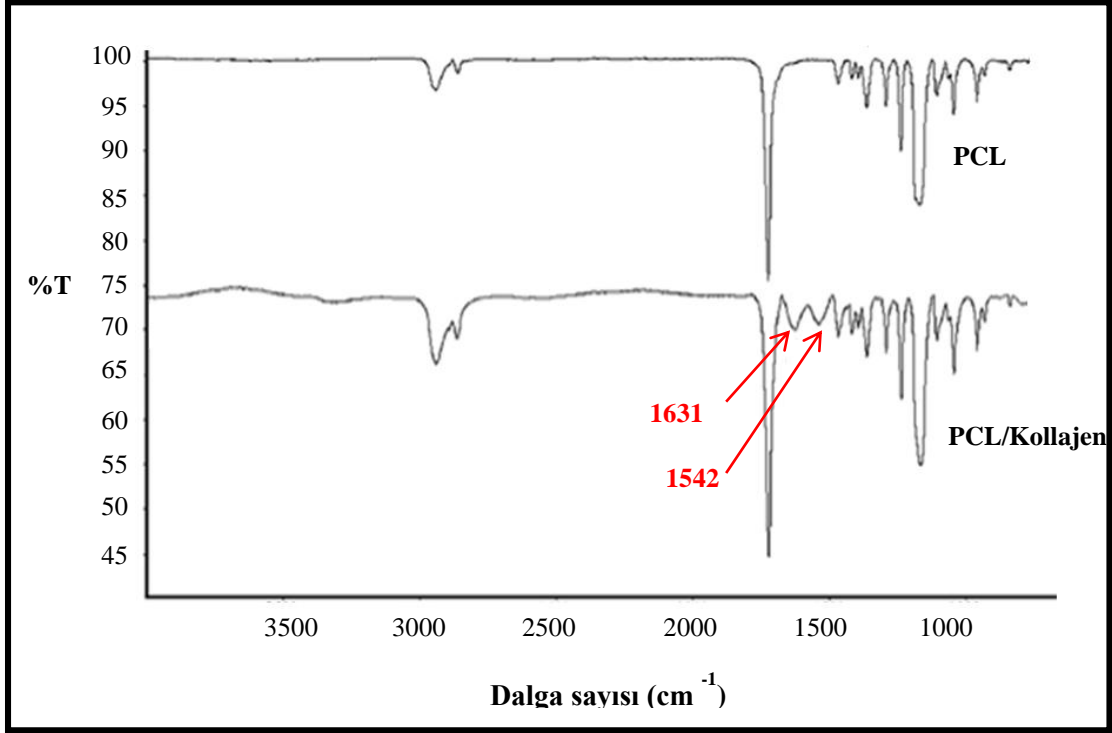
SEM analizleri incelendiğinde gelişigüzel homojen yapıdaki boncuksuz PCL/COL lifler görüldü. PCL/COL liflerin ortalama çapı 625 ± 50 nm olarak hesaplandı (JMicrovision) (Resim 4.4).



Resim 4-4. PCL-COL elektro-eğirme yapılmış farklı büyütmelelerdeki membran görüntüleri: (a) 1000X, (b) 5000X, (c) 10 000X, (d) 10 000X.

PCL- COL nanofibröz membranın Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) Spektroskopisi ile analizi

Kollajenin yapıya katılıp katılmadığının belirlenmesi amacıyla PCL ve PCL/COL membranlara ait FTIR-ATR analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2' de sunuldu.



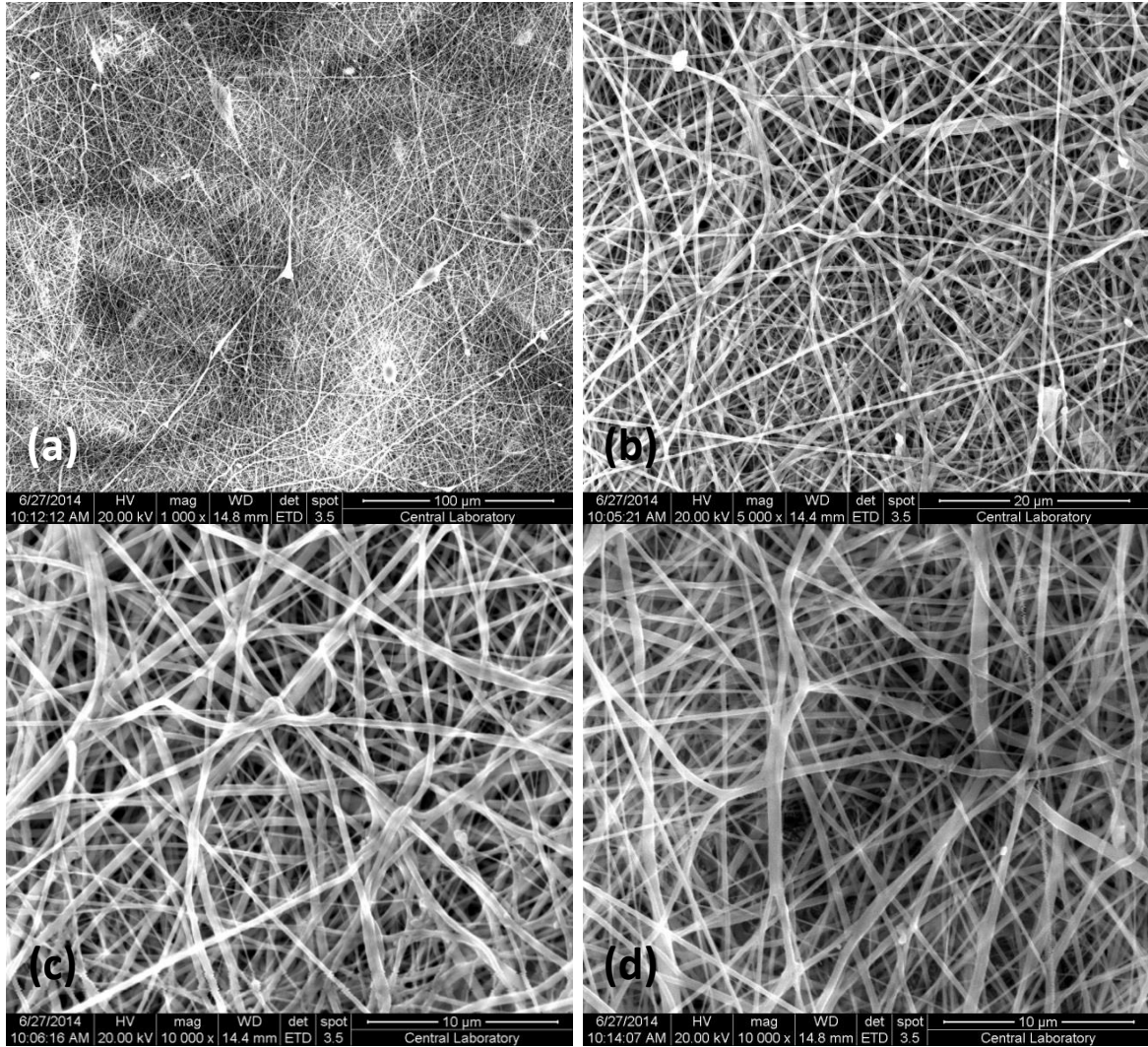
Şekil 4.2. PCL ve PCL/COL membranlara ait FTIR-ATR spektrumu

PCL ve PCL/COL membranlara ait spektrumlar incelendiğinde, kollajen yapısında bulunan fonksiyonel gruplar sırasıyla 1631 ve 1542 cm⁻¹ dalga sayısında Amid-I ve Amid-II pikleri görülmektedir. Bu piklerin varlığı kollajenin PCL yapısına başarıyla katıldığını göstermektedir.

PCL-COL-BMP-7 nanofibröz membranın SEM ile incelenmesi

SEM görüntüleri incelendiğinde membranın diğer yüzeyindeki kaplamaya benzer şekilde homojen bir yapıda boncuksuz PCL-COL-BMP-7 liflerin varlığı gözlemlendi. BMP-7 eklenmesinin membranın yapısını bozmadığı saptandı.

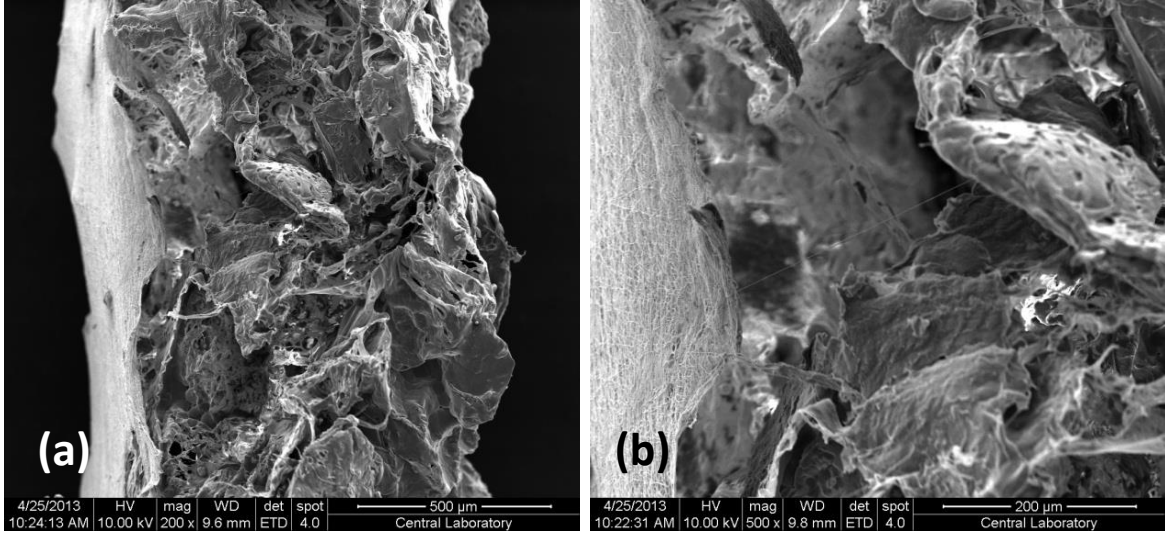
JMicrovision programı kullanılarak yapılan analizde PCL-COL-BMP-7 liflere ait ortalama çap değeri 565±40 nm olarak hesaplandı (Resim 4.5).



Resim 4-5. PCL-COL-BMP-7 membranlara ait SEM görüntüleri:
(a) 1000X, (b) 5000X, (c) 10 000X, (d) 10 000X.

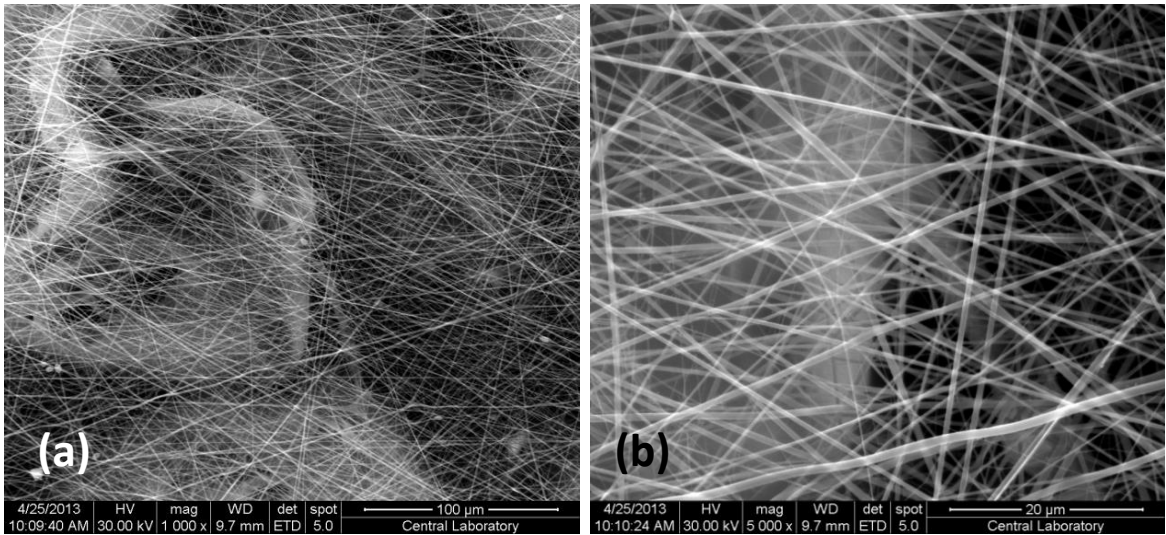
4.1.3. Üç tabakalı membranların karakterizasyonu

SEM analizi ile elde edilen üç tabakalı membrana ait kesit görüntülerinde elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulmuş PCL-COL lifler, PCL-nHA iskele üzerinde yüzeyden kopma ya da ayrılma göstermediği izlendi (Resim 4.6).



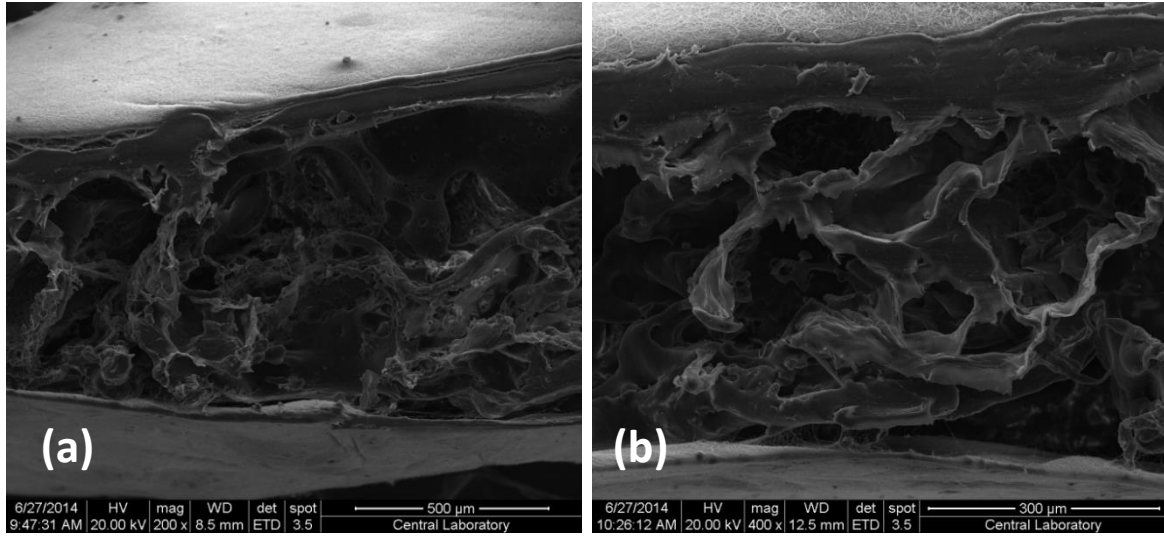
Resim 4-6. PCL-COL kaplı PCL-nHA membranının enine kesit görüntüleri:
(a) 200X, (b) 500X.

SEM analizi ile elde edilen üç tabakalı membrana ait yüzey görüntüleri Resim 4.7’de sunuldu. Üç katlı oluşturulan bu membranın SEM görüntülerinde, tek katlı nanofibröz yapıdaki PCL-COL ve PCL-COL-BMP-7 tabakalarının altında bulunan PCL-nHA yapısındaki iskele görüldü.



Resim 4-7. PCL-COL-BMP-7 kaplı PCL-nHA membranının yüzey kesit görüntüleri:
(a) 1000X, (b) 5000X.

Resim 4.8’de her iki yüzeyine elektro-eğirme yapılan n-HA iskelelerinin enine kesit görüntüsünde membranın iki tarafında da ayrılma gözlenmemekle beraber stabil tabakaların oluştuğu açıkça görüldü.

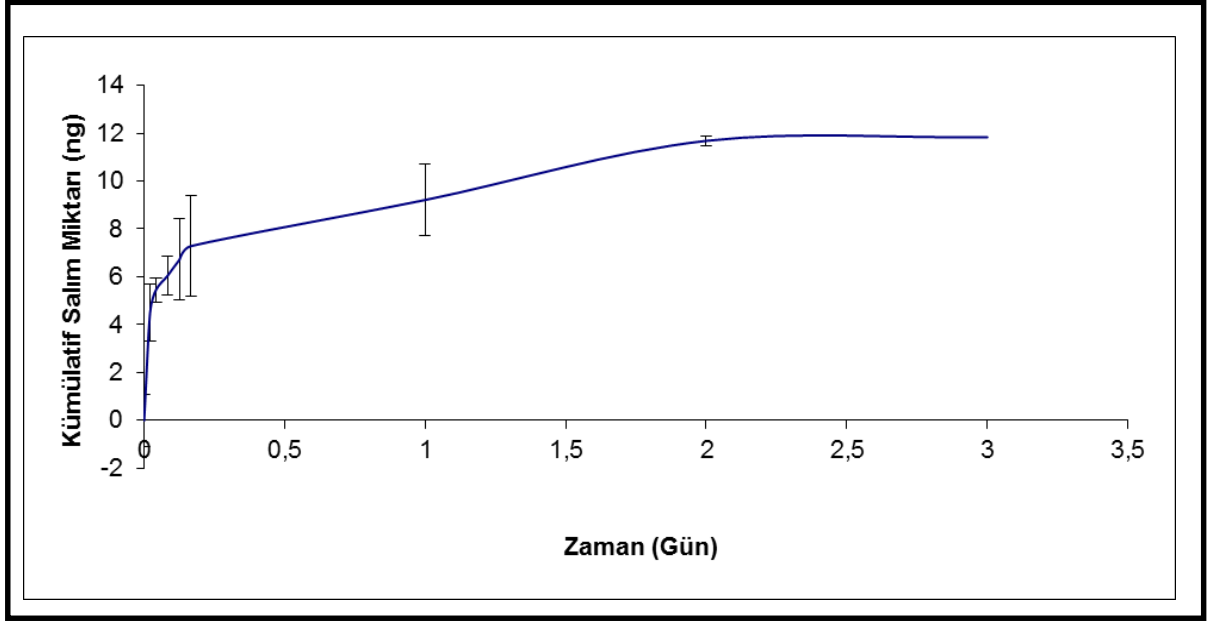


Resim 4-8. Tek tarafı PCL-COL-BMP-7 kaplı diğer tarafı PCL-COL kaplı PCL-nHA membran görüntüleri: (a) 200X, (b) 400X.

4.2. rhBMP-7 Moleküllerinin Üç Tabakalı Membranlardan Kontrollü Salımının İncelenmesi

Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesinin üyesi olan rhBMP-7 moleküllerinin hasarlı bölgeye uygun şekilde yerleştirilebilmesi için PCL/COL liflerin içerisine hapsedilmesine karar verildi. rhBMP-7'nin üç tabakalı membrandan salımının incelenmesi amacıyla in vitro ortamda salım çalışmaları gerçekleştirildi. Kümülatif salım değerleri kullanılarak elde edilen salım grafiği Şekil 4.3' te sunuldu.

rhBMP-7 salımı incelendiğinde ilk 4 saat sonunda yüklenen miktarın %42'sinin ortama salındığı gözlemlendi. Ardından devam eden kontrollü salım davranışının 3 gün boyunca devam ettiği saptandı.



Şekil 4.3. Üç tabakalı membranlardan BMP-7 salımının incelenmesi

4.3. Membranın In Vitro Öncesi Sterilizasyonu

25 kGy olarak uygulanan Gamma radyasyonu ile herhangi bir kontaminasyona maruz kalmadan membranların sterilizasyonunun sağlandığı hücre kültür çalışmalarında görüldü.

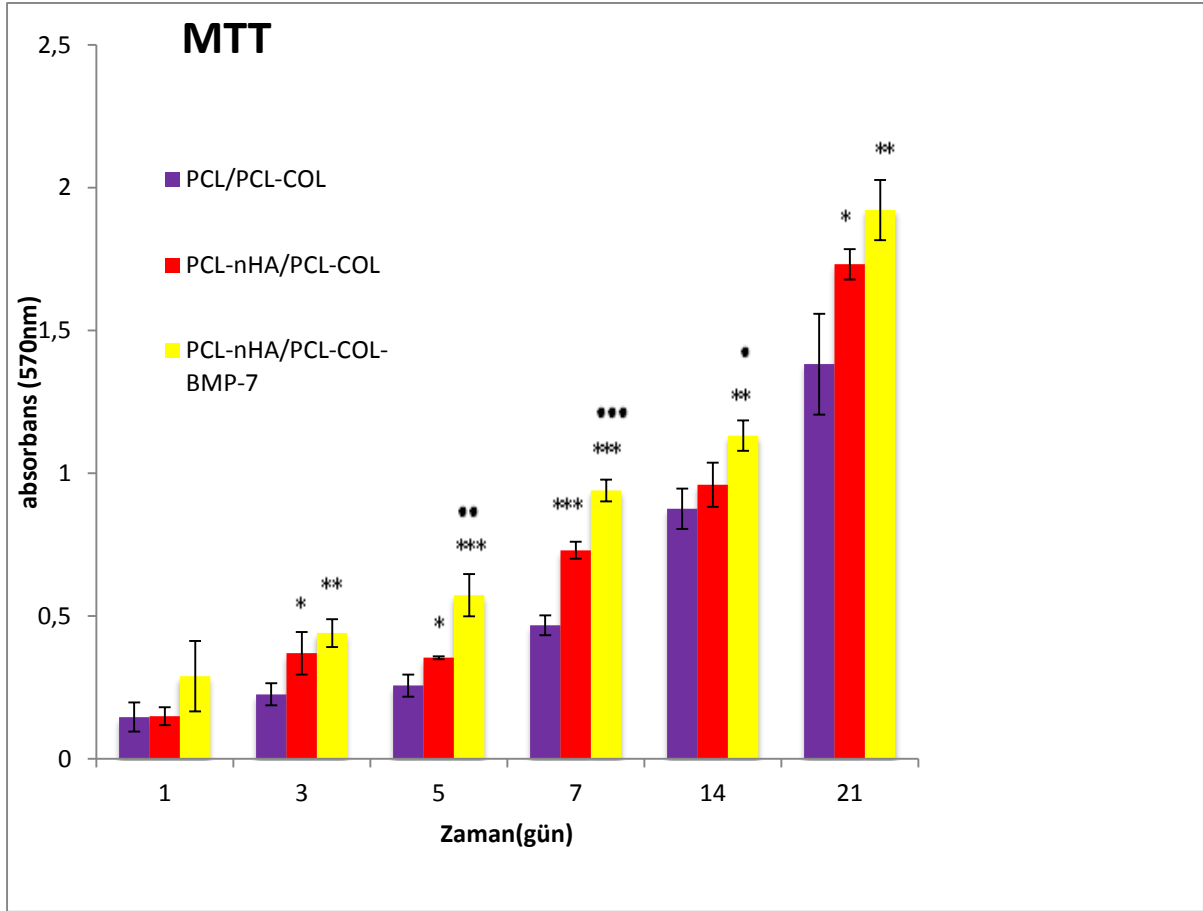
4.4. Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre kültürü çalışmalarında pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı kullanıldı. Çalışmamızda sentezlenen PCL/ PCL-COL, PCL-nHA/PCL-COL, PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranları 21 gün boyunca hücre kültüründe incelendi.

Yapılan analizler ile pre-osteoblastik hücrelerin membranlar üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve osteoblastik farklılaşmaları incelendi.

4.4.1. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür (MTT) analiz

MC3T3-E1 hücrelerinin üç farklı membran üzerindeki zaman içerisinde gerçekleşen mitokondriyal aktiviteleri yani canlılıkları ve çoğalmalarındaki değişim MTT analizi ile belirlendi. Sonuçlar 1., 3., 5., 7., 14. ve 21. günlerdeki optik yoğunluk değerleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. İstatistiksel olarak n=3, kontrol grubu PCL/PCL-COL iken * p<0,05; *** p<0,001 kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken • p<0,05 , ●● p<0,01, ●●● p<0,001.

Hücre ekiminden sonra tüm gruplarda hücreler tutunarak çoğalmaya devam ettiler. Kültürün ilk gününde hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Üçüncü ($p<0,05$), beşinci ($p<0,05$), yedinci ($p<0,001$) ve yirmi birinci gün ($p<0,05$) sonunda PCL-nHA/PCL-COL grubunun PCL/PCL-COL grubuna göre daha hızlı çoğaldıkları gözlemlendi.

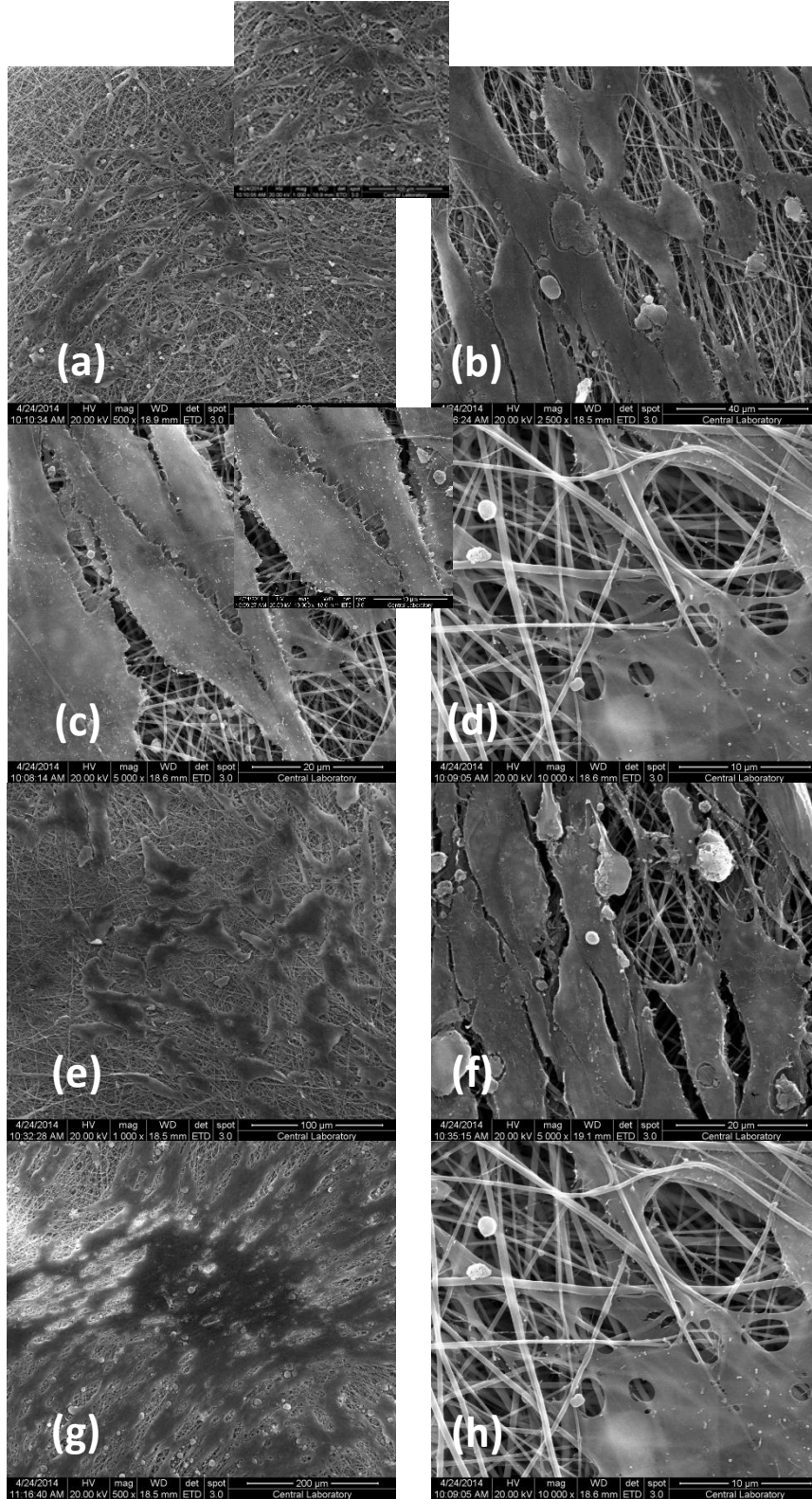
PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda hücreler giderek çoğalırken PCL/PCL-COL grubuna göre birinci gün hariç tüm günlerde anlamlı olarak fazla çoğaldığı gözlemlendi. Aynı grup PCL-nHA/PCL-COL grubu ile karşılaştırıldığında ise beşinci ($p<0,05$), yedinci ($p<0,01$) ve ondördüncü günlerde ($p<0,001$) mitotik aktivitelerinin de daha yüksek olduğu bulgularlandı.

Sonuç olarak MC3T3 hücrelerinin üç farklı membrana tutunup çoğaldığı, fakat en yüksek hücre üreme hızını PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 üzerinde gösterdikleri belirlendi.

4.4.2. Membranlar üzerinde hücre tutunma özelliğinin SEM ile analizi

Hücrelerin doku iskelesinin yüzeyine tutunması ve yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Membranlar ile hücreler arası etkileşim ve hücrelerin morfolojileri SEM analizi ile incelendi. SEM görüntülerinde MC3T3-E1 hücrelerinin nanolif yüzeyler üzerinde farklı özellikler sergilediği gösterildi.

4. günden itibaren kontrol grubu olan PCL/PCL-COL membranın yüzeyine hücrelerin tutundukları ve yayıldıkları açıkça gözlemlendi (Resim 4.9 a,e,f,g). Aynı zamanda hücreler liflere tutunup lifin yönüne doğru şekillerini verdikleri ve fibroblastik şekil olan iğsi formda oldukları izlendi (Resim 4.9 b,c). Daha büyük büyütmede incelendiğinde ise hücrelerin içsel bağlantısı olan gözeneklerden iç bölgelere üç boyutlu olarak yayılmaya devam ettiği görüldü (Resim 4.9 c,d). 7. gün ve 14. gün SEM görüntüleri incelendiğinde hücrelerin sitoplazmik uzantılarının nanoliflerin arasından girerek çoğaldıkları gösterildi (Resim 4.9 f,h). Kültür ortamındaki hücrelerin membrana tutunmaları günlere göre değerlendirildiğinde, hücre yoğunluğunun 14.günde 4. güne göre arttığı bulgulandı. Bu sonuç MTT bulguları ile paralellik gösterdi. MTT testi ile elde edilen pozitif bulgularla membranın hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığını gösterildi (Resim 4.9 a,g).



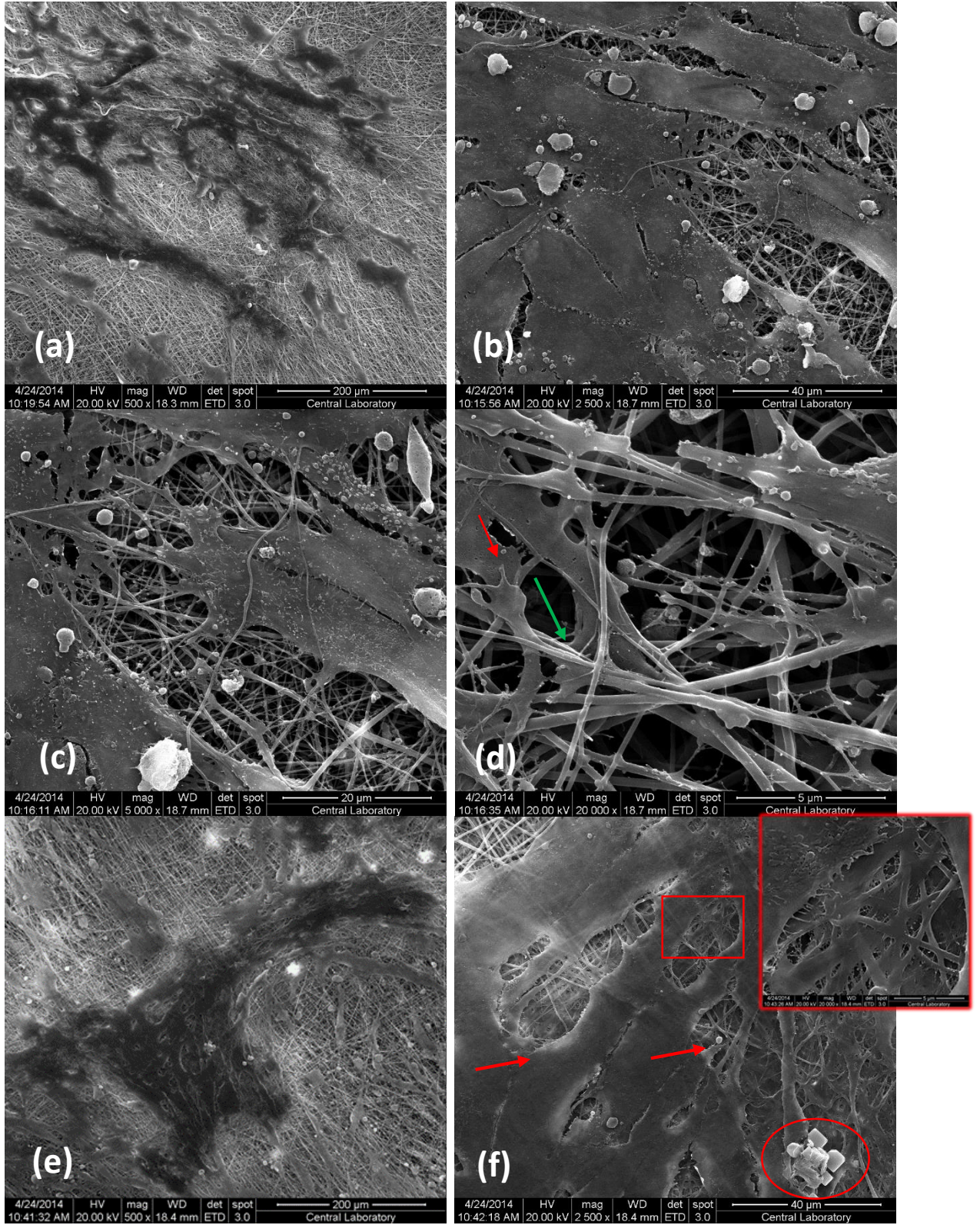
Resim 4-9. PCL/PCL-COL membran görünümüleri:

- (a) 4.gün, 100X; (b) 4. gün, 2500X; (c) 4. gün, 5000X; (d) 4. gün, 10 000X;
 (e) 7. gün, 1000X; (f) 7. gün, 5000X; (g) 14. gün, 500X; (h) 14. gün, 10 000X.

PCL-nHA/PCL- COL membranının kültürün 4., 7. ve 14. günlerindeki görüntüleri sırasıyla ayrıntılı olarak Resim 4.10'de verildi. Bu gruptaki HA varlığının hücrenin canlılığı ya da morfolojisi üzerinde herhangi sitotoksik bir etki yaratmadığı görüldü.

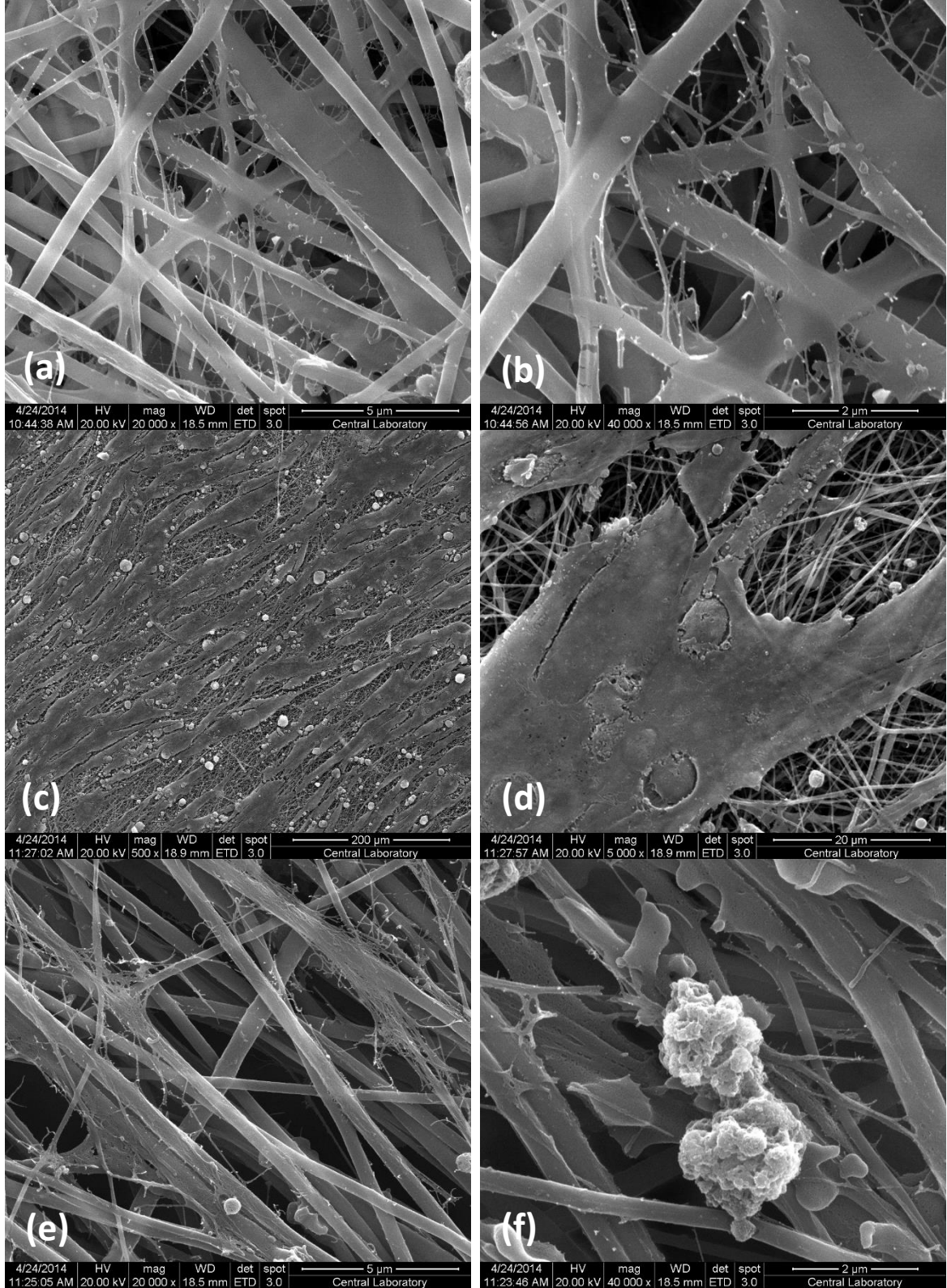
Resim 4.10 ve 4.11'de görüldüğü üzere kültürün 4. ve 7. gününde alınan PCL-nHA/PCL-COL membranından alınan görüntülerde, hücrelerin yayılımı sadece liflerin üzerinden değil, gözeneklerin arasından ilerleyerek alt katmana (PCL-nHA iskelesine) doğru da üç boyutlu şekilde çoğaldıkları gözlemlendi.

Resim 4.9 b ile 4.10.c görüntüleri karşılaştırıldığında PCL-nHA/PCL-COL membranının PCL/PCL-COL grubuna göre ECM üretiminde daha etkili olduğu gösterildi. PCL/PCL-COL grubunda mineral kümeleri 14. günde oluşurken, PCL-nHA/PCL-COL membranında mineral nodüllerinin 7. günde ECM'nin içerisinde kaldığı görüldü (Resim 4.10 f). Resim 4.11 f görüntüsünde ise PCL-nHA/PCL-COL membrana ait 14. gündeki mineral kümeleri 40 000X büyütme ile gösterildi.



Resim 4-10. PCL-nHA/PCL-COL membran görünümleri:

- (a) 4.gün, 500X; (b) 4. gün, 2500X; (c) 4. gün, 5000X; (d) 4. gün, 20 000X;
(e) 7. gün, 500X; (f) 7. gün, 2500X



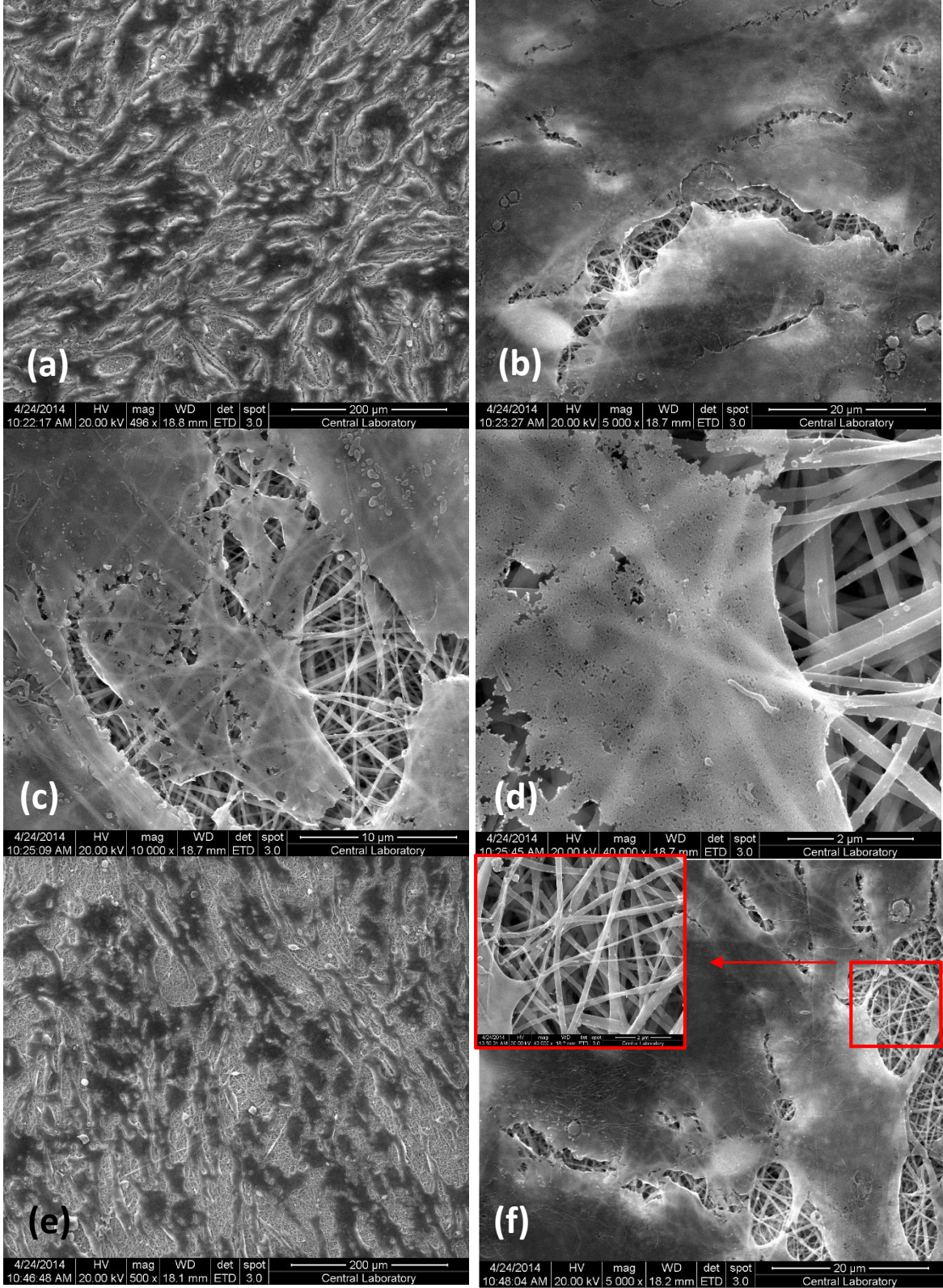
Resim 4-11. PCL-nHA/PCL-COL membran görünümüleri:

- (a) 7.gün, 20 000X; (b) 7. gün, 40 000X; (c) 14. gün, 500X;(d) 14. gün, 5000X;
 (e) 14. gün, 20 000X; (f) 14. gün, 40 000X.

PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranının SEM görüntüleri Resim 4.12 ve 4.13'te gösterildi. Kültürün 4. gününde BMP-7'li grupta ECM oluşumu daha fazla gözlemlense de hücrelerin ve ECM'in yüzeyde kaldığı gözlemlendi. Kültürün 7. gününde ise diğer gruplardan farklı olarak liflerin içerisinde apatit nanokristal yapının geçtiği görüldü (Resim 4.13 a).

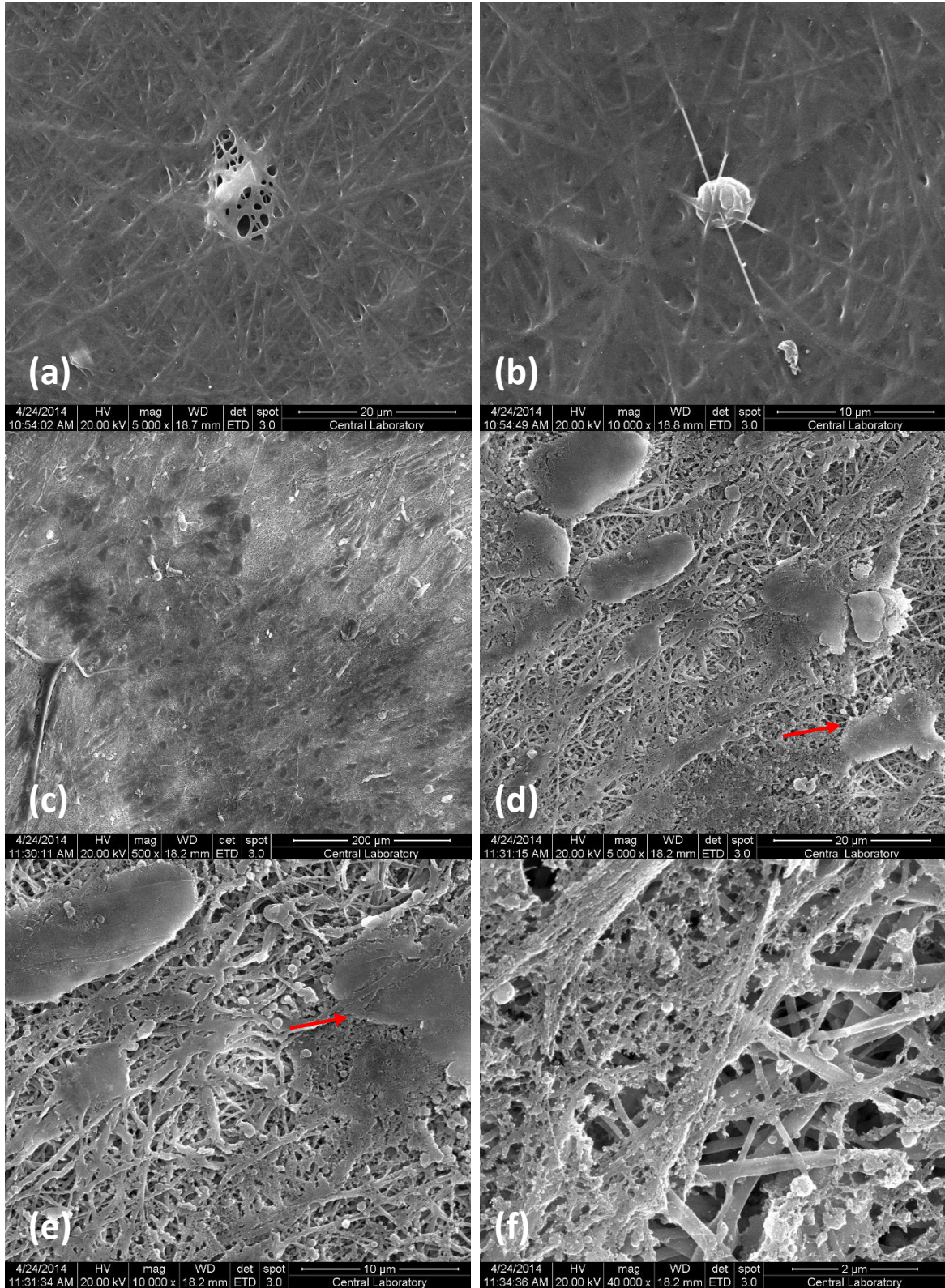
Resim 4-13 d ve e'de rhBMP-7 de liflerin arasındaki hücrelerin 14. günde birbiriyle ECM yapısı ile bağlandığı kaydedildi. Resim 4.13 f'ye bakıldığında ise tüm membran liflerinin yüzeyinde hücrelerin tutunup lif boyunca uzadığı görüldü.

Gruplar arasında 14. gündeki görüntüler karşılaştırıldığında membran yüzeyini en çok kaplayan, PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubu oldu. Bu sonuç MTT sonuçları ile uyumlu bulundu (Resim 4.13 c,d).



Resim 4-12. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membran görünümleri:

- (a) 4.gün, 496X; (b) 4. gün, 5000X; (c) 4. gün, 10000X; (d) 4. gün, 40 000X;
(e) 7. gün, 500X; (f) 7. gün, 5000X.



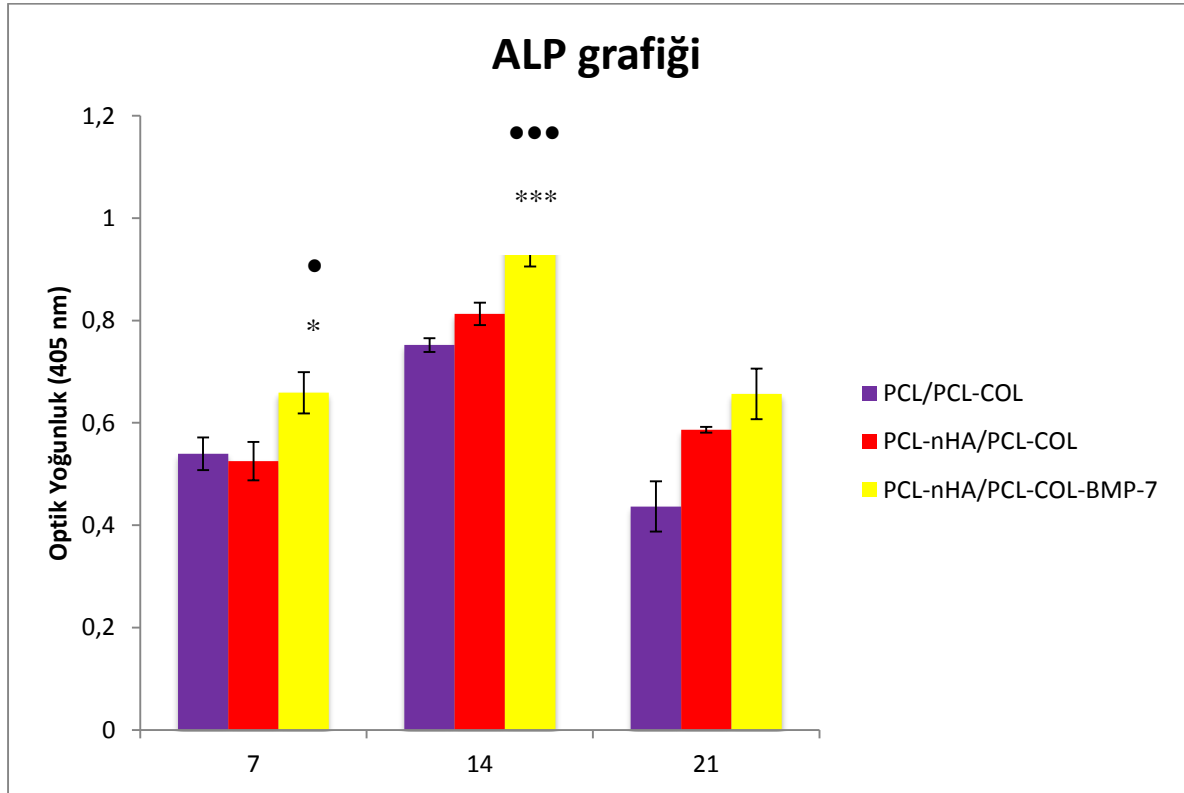
Resim 4-13. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membran görünümleri:

- (a) 7.gün, 5000X; (b) 7. gün, 10 000X; (c) 14. gün, 500X; (d) 14. gün, 5000X;
(e) 14. gün, 10 000X; (f) 14. gün, 40 000X.

4.4.3. ALP analizi

Mineralizasyonun gözlemlenebilmesi için membranlar farklılaştırma ortamında 7.,14. ve 21. gün sonrası alkalin fosfataz (ALP) yöntemi ile boyandı. Hücrelerin erken dönem osteoblastik aktivitesini göstermek için yapılan analiz sonuçları spektrofotometrede okunarak nm cinsinden optik yoğunluk değerleri verildi.

Yapılan analizde 7. günde hücreler PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda ALP aktivitesi açısından her iki gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Şekil 4.5). Ancak nHA'nın ALP aktivitesinde etkili olmadığı görüldü. Kültürün 14. gününde ALP aktivitesinin tüm membranlarda en yüksek değere ulaştığı, en çok aktivitenin PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda olduğu gözlemlendi. Kültürün 21. gününde ise ALP aktivitesi tüm gruplarda düşerek, en yüksek değer BMP-7 varlığında görülse de diğer gruplar ile arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



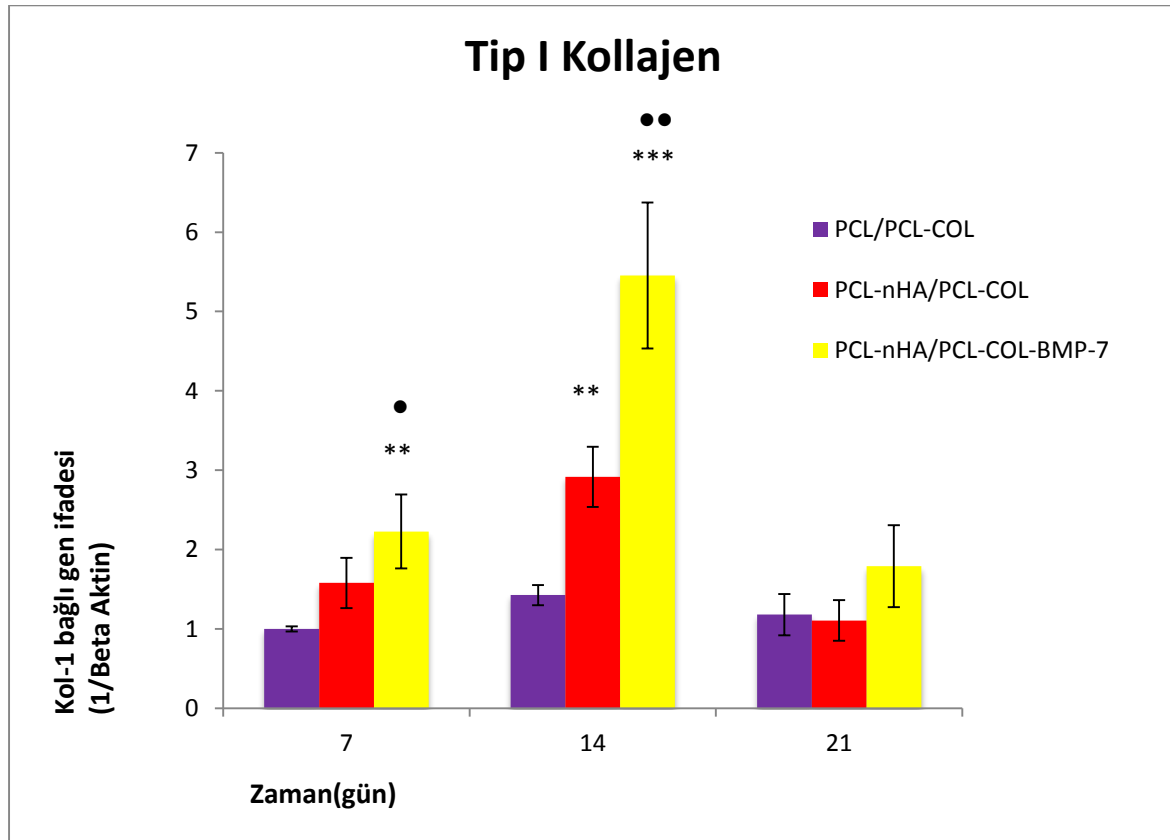
Şekil 4.5. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL: PCL-COL iken, * p<0,05;*** iken p<0,001; kontrol grubu PCL-nHA: PCL-COL iken • p<0,05; ••• iken p<0,001.

4.5. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonları (RT-PCR) Analizleri

Tip I Kollajen

Kollajen sentezi erken dönem belirteci sayılabilir. Çalışmamızda hücre kültürü sonucunda ortaya çıkan sonuçlarda 7 ve 14. günlerde kollajen sentezi daha hızlı olurken, bunun 21. günde azaldığı gösterildi (Şekil 4.6).

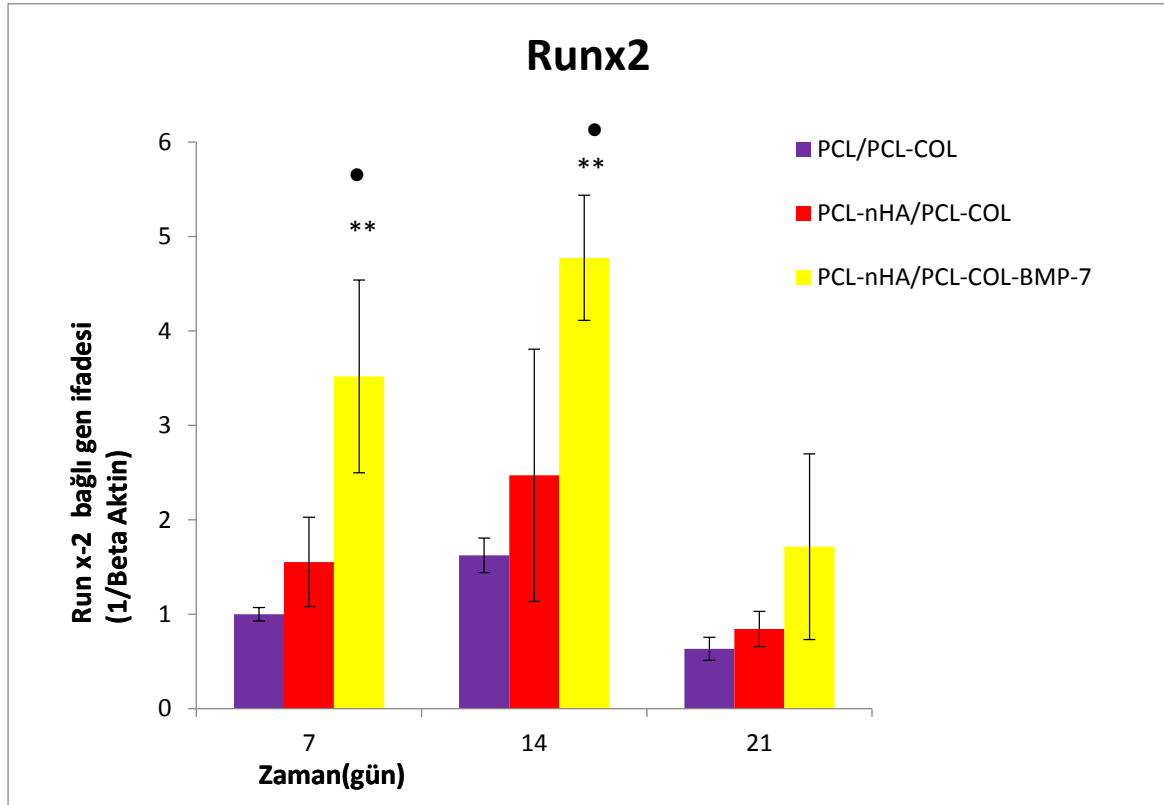
Şekil 4.6'ya göre, kültürün 7. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membrandaki tip I kollajen sentezi diğer iki grup membrandan anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. Kültürün 14. gününde ise salım seviyesi PCL/PCL-COL membrana göre, PCL-nHA/PCL-COL membranında yaklaşık iki katı, PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranında ise yaklaşık 4 katı fazla olduğu gözlemlendi. Hücre kültürünün devamında 21. günde kollajen seviyesinde gruplar arasında herhangi anlamlı bir farklılık bulunmadı.



Şekil 4.6. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/PCL-COL iken, * p<0,05; ** iken p<0,01;*** iken p<0,001; kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken ● p<0,05; ●● iken p<0,01.

Runx-related transcription factor 2 (Runx2)

Diğer bir osteojenik belirteç olan MC3T3 hücrelerinin Runx2 salım seviyelerine bakıldığında kültürün 7. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranda PCL/PCL-COL membrana göre 3.5 kat, PCL-nHA/PCL-COL membrana göre ise 2 kat fazla salındığı bulguları. Kültürün 14. gününde ise PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membran diğer iki gruba göre anlamlı derecede salım seviyesinin arttığı gözlemlendi. Kültürün 21. gününde ise osteoblastik farklılaşmada düzenleyici rol oynayan Runx2'nin düşüş göstermesi, erken dönem bulgusu olduğunu destekledi (Şekil 4.7).

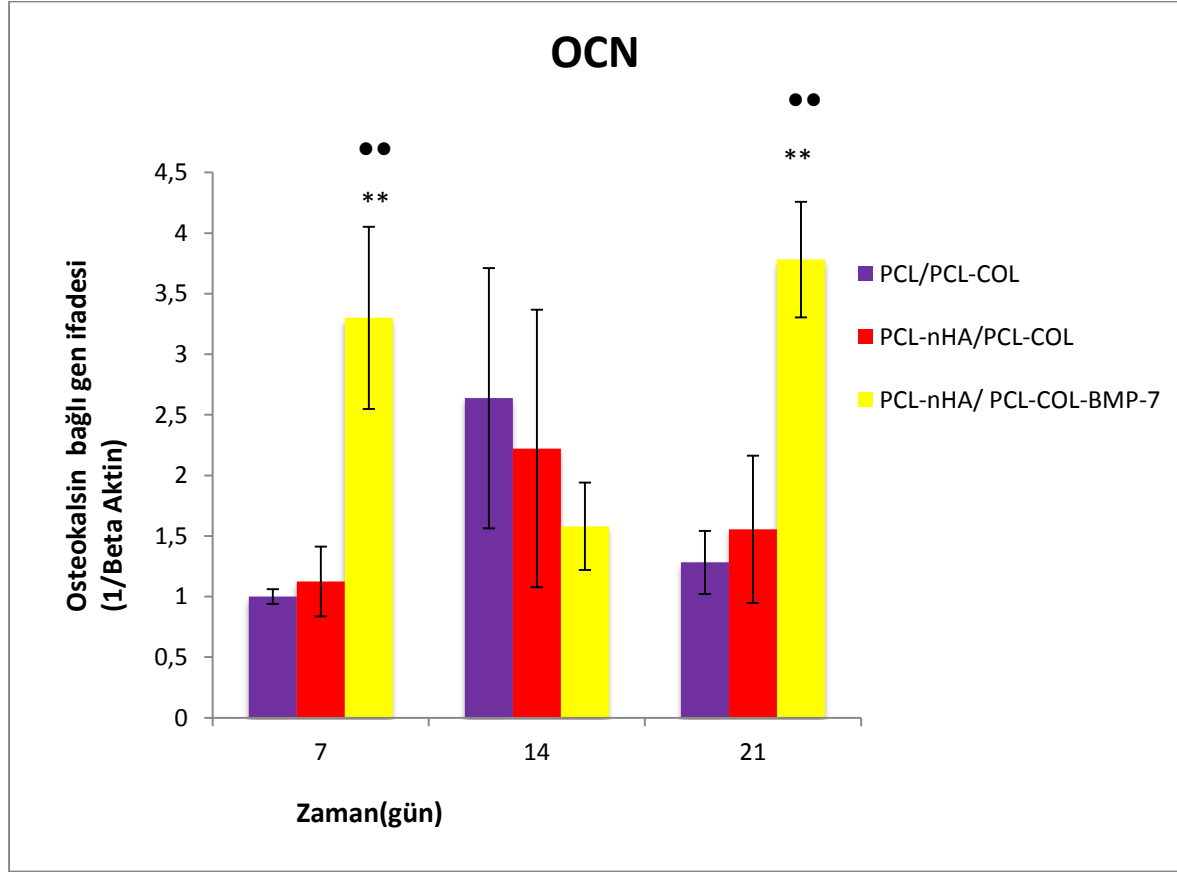


Şekil 4.7. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/PCL-COL iken, * p<0,05 ; ** P<0,01, kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken • p<0,05.

Osteokalsin (OCN)

Osteokalsin (OCN), olgun osteoblastın göstergesi olmasından dolayı farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkar. OCN'nin pre-osteoblast hücre kültüründeki salımı Şekil 4.8'de verildi. Bu şekilde kültürün 7. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membrandaki salım değerleri, diğer iki membrana göre yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlendi. Kültürün 14. gününde salınan OCN miktarı incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı

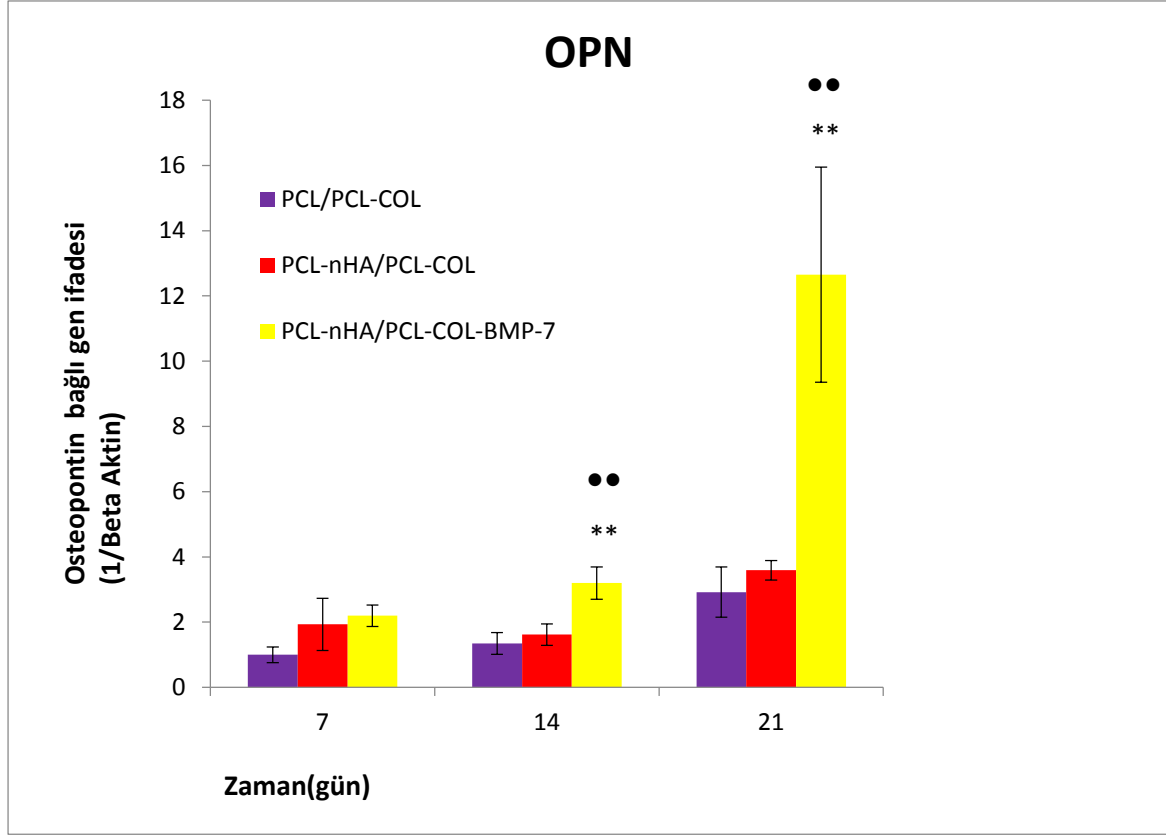
görüldü. Kültürün 21. gününde ise OCN'nin PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranında diğer iki membrana göre yaklaşık 2.5 katı kadar daha fazla salındığı bulgularıdır.



Şekil 4.8. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/ PCL-COL iken, ** p<0,01; kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken ●● p<0,01.

Osteopontin (OPN)

Osteopontinin (OPN) kültürün 7. gününde membranlardan salımı incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.9). Kültürün 14. gününde OPN'nin PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranından PCL-nHA/PCL-COL ve PCL/PCL-COL membranlara göre anlamlı olarak daha fazla salındığı gösterildi. Farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkan OPN'nin salım düzeyinin kültürün 21. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranda diğer iki membrana göre yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.9. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık n=3 kontrol grubu PCL/PCL-COL iken, ** p<0,01; kontrol grubu PCL-nHA/PCL-COL iken ●● p<0,01.

5. TARTIŞMA

Periodontal tedavinin amacı, periodontal dokulardaki enfeksiyonun ortadan kaldırılması ve yıkıma uğramış periodontal ataşman ve alveol kemiğinin yeniden kazanılmasıdır. Geleneksel periodontal tedaviler ile elde edilen iyileşmede çoğu zaman uzun birleşim epiteli ve sınırlı miktarda bağ doku ataşmanı ile birlikte bir miktar kemik dolumu gözlenir [88, 274, 275]. Histopatolojik çalışmalar flep cerrahisi sonrası iyileşme döneminde epitelin kök yüzeyi boyunca defekt tabanına kadar ilerleyerek bağ doku ataşmanını engellediğini ve iyileşmenin uzun birleşim epiteliyle gerçekleştiğini göstermiştir [95, 276, 277].

Periodontal tedavi sonrasında oluşacak iyileşmenin şeklini, kök yüzeyine gelecek hücrelerin tipinin belirlediğini bildiren Melcher'in bu görüşünden yola çıkarak, Nyman ve diğerleri periodontal hastalık nedeniyle ataşman kaybına uğramış dişlerde bariyer membran uygulama sonrası, kök yüzeyinde yeni sement ve içinde sonlanan kollajen liflerle karakterize, yeni ataşmanın varlığını göstermişlerdir [5, 124-126]. Bariyer membranlar, kök yüzeyi ile alveol kemiği arasında boşluk oluşturarak kök yüzeyine öncelikli olarak periodontal ligament kökenli mezenkim hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) tekniği adı verilen bu yöntem yardımıyla periodontal ligamentini kaybetmiş kök yüzeylerinde yeni bağ doku ataşmanının ve alveol kemiğinin yeniden kazanılması hedeflenir [6-8, 19].

Bu amaçla üretilmiş rezorbe olan ve olmayan membranların periodontal defektlerde kullanımı sonrasında klinik ve histolojik olarak çeşitli düzeylerde bağ doku ataşmanı ve kemik dolumunun gerçekleştiği gösterilmiş olmasına rağmen, periodontal rejenerasyonun tam olarak elde edilemediği görülmüştür [13, 74, 151, 278-281]. YDR uygulaması ile elde edilen periodontal rejenerasyonun rezorbe olmayan bariyer membranlarda %77.5, rezorbe olan bariyerlerde ise %70.7'sinin kazanıldığı bulgulanmıştır [282]. İnsan biyopsilerinde yapılan histomorfometrik çalışmaların meta-analizleri değerlendirildiğinde, periyodonsiyumdan elde edilen kesitlerde %75 oranında yeni sement ve periodontal ligament oluşurken, farklı miktarlarda kemik dolumlarının görüldüğü, ortalama cep derinliğinin 5,1 mm olduğu defektlerde 2,6 mm yeni sement ile 1,7 mm kemik dolumunun oluştuğu bildirilmiştir [283]. YDR uygulamaları sonrası elde edilen ataşman miktarının her vakada aynı olmadığı, hastaya ve hekime bağlı faktörler olarak özetleyebileceğimiz çeşitli faktörlerin rejenerasyon potansiyelini etkileyebileceği saptanmıştır [19, 152].

Çalışmamızda YDR'de kullanılan membranların rejenerasyon potansiyelini artırmak amacıyla doku mühendisliği prensiplerinden yararlanarak, epitelin erken dönemde yara bölgesine girmesine engel olacak fiziksel bariyer özelliklerini, yeni kemik oluşumu için iskelet görevi görecek matriks yapısını, bağ doku ataşmanı ve kemik oluşumunu indükleyecek sinyal moleküllerinin yavaş salımını yapacak, üç tabakalı hiyerarşik sırayla görev gören multifonksiyonel bir "prototip membran" üretmeyi planladık.

Bu prototip membran, iyileşmede gerekli şartları sağlayacak biyolojik yapıların vücut dışında üretilerek kaybedilmiş veya hasar görmüş dokulara yerleştirilmesiyle bu dokuların yeniden kazanılmasını hedefleyen doku mühendisliği prensiplerine göre üretildi. İçeriğini, dişeti bağ dokusu ve alveol kemiğinin organik ve inorganik bileşenlerini taklit eden biyomateryallerin oluşturduğu membrana mezenkim hücrelerinin tutunması, üremesi, farklılaşması ve çoğalmasını sağlayacak bir biyosinyal molekülü (rhBMP-7) eklendi [250, 252, 284, 285].

Üç tabakadan oluşan bu prototip membranın her bir tabakası ayrı ayrı görevleri gerçekleştirmek için tasarlandı. Farklı yöntemlerle üretilen üç tabakadan oluşan membranın esas destekleyici iskeleti polikaprolakton (PCL) yapısında üretildi. Dişeti epiteli ve bağ dokusu hücrelerinin kök yüzeylerine gelmesini engellemek amacıyla bariyer görevi görecek olan dış tabaka ve kök yüzeyine bakan iç tabaka PCL ve kollajenden (COL) üretildi. İskeleyi oluşturan orta tabaka bir grupta sadece PCL, diğerinde PCL'ye nanohidroksiapatit (nHA) eklenerek oluşturuldu. Üçüncü grup membranda ise periodontal ataşman oluşumunun hızlandırılması ve sementogenezin indüklenmesini amacıyla iç tabakaya, farklı olarak insan rekombinant kemik morfojenik protein-7 (rhBMP-7) eklendi.

Diş hekimliğinde ve tıpta çeşitli dokuların rejenerasyonunda kullanılan büyüme faktörleri, daha düşük dozda uzun süreli aktivite sağlaması amacıyla yavaş salım yapan taşıyıcılar ile kullanılmaktadır [286, 287]. Büyüme faktörlerinin taşıyıcı ile beraber bulunması yara bölgesindeki hücre popülasyonunu uyararak ve onları yönlendirerek periodontal doku iyileşmesini hızlandırır [166, 288]. Günümüzde doku mühendisliği prensiplerine göre üretilmiş taşıyıcılar içinde özellikle partiküller (mikro küreler, greftler) [46, 289], enjekte edilebilen hidrojeller (karboksimetilsellüloz, Dex-GMA, kollajen) [287, 290-292], poröz yapıli sponjlar (kollajen, β -TCP, kalsiyum karbonat) [293, 294] ve son olarak çok tabakalı üretilen PCL iskeleleri araştırılmaktadır [52, 146, 166, 217, 270, 288, 295, 296].

Periodontolojide bu tip materyaller, salım karakteristiği veya fiziksel özelliklerine göre büyüme faktörleri için rezervuar görevi görmesi ve yavaş salım yaparak kemik gelişimi ve bağ doku ataşmanını hızlandırması için kullanılmaktadır [297-302]. Hayvan ve klinik çalışmalarında EMD [303, 304], BMP'ler [305-311], PDGF-BB [50, 312], FGF-2 [237, 313-316], GDF-5 [294, 317-320] ve P-15 [51, 321] gibi büyüme faktörleri ve biyosinyal moleküllerinin taşıyıcı polimerler içerisinde kullanımının periodontal doku iyileşmesini hızlandığı gösterilmiştir.

Son yıllarda çalışmalar yumuşak ve sert dokunun iyileşmesini sağlamak üzere doğru zamanda doğru yerde etkin rol oynayacak çok katlı taşıyıcıların kullanımına doğru yönelmektedir. İlaç salım cihazı ve dikiş malzemesi olarak FDA'dan onay almış sentetik bir polimer olan PCL, gözenek boyutlarının ve rezorpsiyon süresinin ayarlanabilirliği ile mekanik direncinin yüksek olması nedeniyle YDR ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [200]. Lekovic ve Kenney (1993) köpeklerin azı dişlerinde oluşturdukları deneysel defektlerde YDR amacıyla ilk kez PCL membranı kullanmışlardır. Araştırmacılar, 6 aylık histomorfolojik değerlendirmelerde PCL yapısındaki membranın bağ doku ataşmanı, yeni kemik formasyonu ve sement birikimini sağladığını bulmuşlardır [71]. PCL mekanik direnci yüksek, biyoyumlu yapısı ve bozunmasının geç olması nedeniyle membranımızda esas polimer olarak kullanılmıştır [52, 211, 322].

PCL'nin biyoyumluluğunu artırmak, ekstrasellüler matriks (ECM) topografisini ve içeriğini taklit ederken iyi bir mekanik stabilite elde etmek amacıyla membranın üretiminde iç ve dış tabakalarına PCL ve sığır kaynaklı tip I kollajen elektro-eğirme tekniğiyle eklendi [70, 138, 139, 290, 320]. Ayrıca bu uygulamayla, PCL'nin nötralize edici biyoyumlu malzemelerle karıştırılmasının degradasyon sonrası oluşacak asidik ortamın pH'sının artmasına da yardımcı olacağı düşünüldü [139, 318, 319].

Alveol kemiği ve bağ dokunun ECM'sini oluşturan tip I kollajen, damar ve doku bütünlüğünün kaybedilmesini takiben peptitler halinde açığa çıkar. Yara bölgesine gelen trombositler pıhtılaşma sürecinde kollajene bağlanarak pıhtı oluştururlar. Diğer yandan kan damarları oluşumu ile makrofajlar ve bölgeye göç eden fibroblastlar büyüme faktörlerini ortama salarlar [323]. PDGF ve TGF- β gibi yarada bulunan faktörler yeni oluşan kollajen matrikste fibroblastları uyarır ve yaranın iyileşmesini sağlar. Fibroblastların ECM'deki kollajenin üzerine yapışması $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 1$ hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla olur [324-

326]. ECM’de bulunan kollajen, bu reseptörler aracılığıyla fibroblastlar için kemotaktik rol oynar. Aynı zamanda ECM’deki fibronektin fibroblastların üzerindeki $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ hücre yüzey reseptörleri ile bağlanır. ECM’de bulunan bu fibronektin gibi glikoproteinlerin hücre ile bağlanması sonucu yaranın kontraksiyonu, anjiyogenezi ve yaralı dokuların birbirine bağlantısı gerçekleşir. Fibroblastların fibronektin ve doku kollajeni ile olan bağlantısına benzer şekilde, dişetindeki fibroblastlar da kollajen membrana bağlanırlar [74, 146, 327]. Membranın dişetine komşu tabakası üretilirken PCL yapısına tip I kollajen karıştırılmasının bir diğer amacı, fibroblastların membranın dış tabakasındaki kollajene tutunarak membran-doku bütünlüğünü sağlamasıdır.

Klinikte sık kullanılan kollajen membranların en önemli dezavantajları hızlı degradasyon ve boşluk oluşturmadaki mekanik özelliklerinin yetersiz oluşudur [328]. Biyomateryal içinde kollajenin varlığı, makrofajlar, epidermal hücreler ve fibroblastlar tarafından salınan kollajenaz enzimini artırarak PCL kristal çekirdeklerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olur [323, 329]. Böylece hızlı degrade olan kollajenin yavaş degrade olan PCL ile karıştırılması, PCL’nin degradasyonunu hızlandırırken kollajenin enzimatik degradasyonunu azaltabilir [329]. Kollajenin hızlı degradasyonunu engellemek için gluteraldehit gibi çapraz bağlayıcı kimyasallar kullanılır [145]. Ancak membran içerisinde kalan artık gluteraldehitin, toksisitesi, damarlanmayı geciktirmesi ve por genişliğini azaltması gibi olumsuz etkileri bulunur [145]. PCL ve kollajenin biraraya getirilerek membranın fiziksel özelliklerinin artırılması, gluteraldehitle çapraz bağlama ihtiyacını da ortadan kaldıracığından membranın üretiminde gluteraldehit kullanılmadı [328, 330].

Kollajenin çalışmamızda tercih edilmesinin bir diğer amacı da düşük antijenisite ile kitosan ve sentetik polimerlere göre yüksek biyobozunmaya sahip olmasıdır. Kitosanın dental ve medikal pek çok alanda sayısız çalışmaları mevcut olmasına rağmen, in vivo uygulamalarda özellikle ilk 1 ve 2. haftalarda şiddetli iltihabi reaksiyona neden olması en önemli dezavantajıdır [331].

Membranın “iskele” olarak adlandırdığımız tabakası, bir grupta sadece PCL’den, diğer iki grupta PCL-nanohidroksiapatitten (nHA) hazırlandı. Periodontal rejenerasyondaki hedeflerimizden biri olan alveol kemiğinin rejenerasyonu için mekanik ve biyolojik özellikleri kemiğe benzeyen nano HA yapısı membranın iskele tabakasına eklendi.

Kemiğin içerisinde yüksek oranda bulunan kalsiyum fosfat, çoğu zaman kristalize hidroksiapatitten meydana gelirken, aynı zamanda kemiğe sertliğini kazandırır. Çalışmamızda kemik gelişimine destek görevi görecektir orta tabakaya eklenen HA partiküllerini, osteoblastların yerleşmesi için iskelet oluşturması, mineral birikimini sağlaması, fibronektin ve vitronektin gibi glikoproteinleri bağlaması [332], sentetik polimerler ile birleştirildiğinde kemik ve çevre dokulara hızlı entegre olması [333] gibi özelliklerinden dolayı kullandık. Bir sentetik polimerler olan polilaktik asit (PLA) iskelelerine katılan nHA'nın in vivo olarak değerlendirildiği bir çalışmada, iskeleye nHA eklenmesinin ossifikasyon, trabekülasyon ve ektopik kemik formasyonunu artırdığı bulgulanmıştır [334]. Bir diğer in vitro çalışmada ise nHA'nın kök pulpa hücrelerinin ALP, OPN, OCN, kemik sialoproteini (BSP) ve tip I kollajen salım seviyelerini artırdığı, böylece nHA'nın ECM oluşumunda ve kemik mineralizasyonunda etkin rol oynadığı gösterilmiştir [335].

Yapılan in vitro çalışmalar, TGF- β ailesinden olan BMP-7'nin sementoblast ve PDL kök hücrelerinin çoğalmasını ve kemik mineralizasyonunu gösteren belirteçlerin salımını indüklediğini göstermiştir [251, 252, 285]. Ayrıca BMP-7'nin, pre-osteoblast ve osteoblast hücre kültürlerinde mineral nodül oluşumunu hızlandırdığı bulgulanmıştır [253, 254]. BMP-7'nin bir taşıyıcı polimerle birlikte periodontal defektlere uygulanmasının kök yüzeylerinde sementogenezi [250, 251] ve kemik oluşumunu indüklediği gösterilmiştir [332, 333]. Çalışmamızda membranın köke komşu olacak iç tabakasına BMP-7 eklenerek periodontal ligament hücrelerinin kök yüzeyine migrasyonunun sağlanması ve progenitör hücrelerin sementogenezi uyarması amaçlandı.

Periodontal defekt bölgesinde hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını sağlayacak büyüme faktörlerinin indükleyici etkiye sahip olması için ortamda yeterli dozda bulunmaları gereklidir. Büyüme faktörlerinin etkinliği; uygulanan bölgeye, taşıyıcının türüne, yapısına ve doz miktarına göre değişmekte olup, bu molekülün çeşitli hücre aktivitesi üzerinde çeşitli etkileri bulunur [336-338]. Günümüzde büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemler yardımıyla bölgeye yerleştirilmesi, tek başına yüksek doz ile ortaya çıkan sitotoksik ve yan etkilerin ortadan kaldırılması yanında maliyetinin de azaltılmasını sağlar [165].

Araştırmamızda kullanılmak üzere üretilen PCL/PCL-COL, PCL-nHA/PCL-COL ve PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 olarak adlandırdığımız bu üç farklı membran, hiyerarşik sırayla

görev almak üzere üç tabakalı olarak oluşturuldu. Oluşturulan bu membranların klinik uygulama öncesinde fiziksel ve kimyasal özellikleri, biyouyumluluğu ve hücreler üzerindeki osteojenik etkileri incelendi.

Üç boyutlu doku iskelelerinde hücrelerin tutunması, üremesi, farklılaşması ve hücre göçüne imkan sağlayan yüksek boyutta gözenekler ve gözenekler arası bağlantılara ihtiyaç duyulur [187, 339, 340]. Periodontal doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri yapay ekstrasellüler matris (ECM) görevi görerek geniş periodontal defektlerin tedavisinde hasarlı bölgeye hücrelerin göçünü artırır [166, 341]. Çalışmamızda, iskele tabakasının üretiminde, gözenek boyutu ve gözeneklilik özelliklerinin kontrol edilebildiği bir yöntem olan çözücü buharlaştırma/parçacık uzaklaştırma tekniği kullanıldı. Bu yöntemde, polimer çözücüsüne suda çözünebilir partiküller eklenerek elde edilen yapıdaki partiküller su ile uzaklaştırılıp gözenekli bir yapı elde edilir. Bu yöntemin bir diğer avantajı da membran kalınlığının istenilen boyutlarda ve şekilde hazırlanabilmesidir. Çözücü buharlaştırma/partikül uzaklaştırma yöntemi kullanılarak üretilen PCL doku iskeleleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, iskelelerin mekanik direncinin yüksek olduğu [342], in vitro olarak iskelelerin hücre atışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve mineralizasyonunu sağladığı [343, 344], fare kalvaryaya defektlerine yerleştirildiğinde ise yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir [343].

Çalışmamızda iskelelerin yüzey yapılarının incelenmesinde sık kullanılan bir yöntem olan taramalı elektron mikroskopisi (SEM) kullanıldı. Membranların yapısal özellikleri SEM’de 40 000 büyütme kadar elde edilen görüntülerde incelendi. Bu görüntülerde membranın orta tabakasındaki gözenekliliği, dış tabakalarındaki nanolif yapıları ve içerisindeki nHA partiküllerinin mikron ve nano boyutları JMicrovision programıyla hesaplandı.

Doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin yapısal özelliklerinden gözeneklerin büyüklüğü, şekli ve birbirleriyle olan bağlantıları uygulanacak doku ile uyumlu olmalıdır [188]. Gözenek özellikleri, hücrelerin doku iskelesinin içine nüfuz etmesi, yayılması, üremesi, besinlerin aktarımı, atıkların uzaklaştırılması ve damarlanmanın gerçekleştirilmesi için önemlidir [188]. Çalışmamızda SEM görüntülerinden elde ettiğimiz verilerde membranın iskele yapısının gözenek boyutları $337 \pm 172 \mu\text{m}$ olarak hesaplandı. Benzer çalışmalarda 200-400 μm ’lik gözenek boyutlarının kemik rejenerasyonu için ideal olduğu belirtilmiştir [57, 187, 345]. SEM analizleri sonucunda osteoblastların iskelenin içerisine

girebilmesi ve alveol kemiğinin oluşabilmesi için gerekli gözenek boyutlarına ulaşıldığı tespit edildi.

İki farklı membranın orta tabakaları olan PCL ve PCL-nHA yapılarını gözenekli hale getirmek için porojen olarak NaCl (tuz) partikülleri kullanıldı. Membranların SEM kesitlerinde yapılan benzer çalışmalarla uyumlu olarak, PCL-DCM çözeltisinin iskele içerisindeki tuzların arasından akarak birbiri ile bağlantılı tünelleri oluşturduğu gözlenmiştir [346, 347]. Çalışmamızda 200-300 µm büyüklüğündeki NaCl (çözelti içerisindeki miktarı: 5 ± 1 µg) partikülleri, PCL-DCM (çözücü) veya PCL-nHA-DCM çözeltilerine %80 oranında eklendi. Liao ve diğerleri (2002) tuz oranını %85 olarak ayarladıkları çalışmada; PLGA içindeki porların birbiri ile bağlantılı olduğunu ve bunun besin alışverişinin sağlanması ve yeni damarların oluşumu için uygun olduğunu belirtmişlerdir [262]. Çözücü buharlaştırma/partikül uzaklaştırma yönteminde tuz kullanımının gözenekli iskele yapısını oluşturmada etkili bir yöntem olduğu görüldü.

Çalışmamızda SEM görüntüleri ile nHA'nın membran içindeki varlığı, büyüklüğü ve membrana tutunması incelendi. nHA üretiminde en sık kullanılan yöntem olan CaPTris yöntemi ile yapılmış bir çalışmada, nHA partiküllerinin boyutu ~90–600 nm olduğu bildirilmiştir [261]. nHA'nın etkinliğinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise, 100-300 nm arasında boyutlara sahip nHA kristallerinin, osteoklastlar tarafından fagosite edildiği, 1-3 µm'den büyük kristallerin rezorbe olamadığı, kristallerin ancak çok çekirdekli dev hücrelerin varlığı ile fagosite edilebileceği bildirilmiştir [348]. Bunun yanında kemik hidroksiapatitin kristal boyutları 30-50 nm uzunlukta, 15-30 nm genişlikte ve 2-10 nm kalınlıkta olduğu belirtilmiştir [349]. SEM görüntülerinde nHA'ların PCL doku iskelesine tutunduğu ve nHA'nın iğsi formu yerine düzensiz şekilde yapılandığı gözlemlendi (Bkz. Resim 4.3-b). JMicrovision ile yapılan analizde nHA yapılarının çapı, kemik dokusunda bulunan hidroksiapatitlere yakın boyutta, 541 ± 162 nm olarak hesaplandı. Diğer yandan SEM görüntüleri aracılığıyla EDX spektrumu incelemesinde Ca/P oranı belirlendi. Membranda hidroksiapatit varlığını gösteren Ca/P oranı $2,16/1,21=1,78$ olarak hesaplandı. Böylece insan kemiğine (Ca/P:1,67) yakın bir yapı oluşturulduğu gösterildi [261].

Elektro-eğirme tekniği rezorbe olabilen polimerlerin kemik hücre matriksine uyumlu, nano boyutta lifler içeren, esnek ve şekil verilebilen bir nanofibröz membran şeklinde üretilmesini sağlar [227, 350-353]. Elektro-eğirme tekniğinde kullanılabilmesi için PCL ve kollajenin bir

çözücüde eritilmesi gerekir. HFIP çözücüsü rutin olarak elektro-eğirme tekniğinde kullanılır. Yapılan çalışmalarda bu işlemin dokular için toksik etki oluşturmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, PCL ve HFIP çözeltisi kullanarak PCL-COL nanofibröz yapının keratinosit hücrelerin membranlara tutunmasını, hücrelerin morfolojilerini ve çoğalmalarını incelemişlerdir [70]. Araştırmada incelenen her iki membranın da klinikte deri defektlerinde ve yanıklarda yara örtücü olarak kullanabileceğini belirtmişler ve HFIP çözücüsünün toksik etkisi olmadığını bulgulamışlardır [70]. Biz de kollajen PCL karışımını elektro-eğirme tekniği için hazırlarken HFIP çözücüsünü kullandık.

Nanofibröz yapılar pre-osteoblastlar için farklılaşmayı indükleyici yapıya sahiptirler [354]. Bu yapıların biyouyumluluğunun değerlendirildiği çalışmalarda, polilaktik-glikolik asit ve jelatinin periodontal ligament hücrelerine tutunduğu ve bu hücrelerin çoğaldığı gösterilmiştir [264, 355, 356]. Bu nedenle çalışmamızda prototip membranın iç ve dış tabakasını oluşturan nanofibröz yapıların üretilmesi için elektro-eğirme tekniği kullanıldı. Membranı bu teknikle oluşturduktan sonra kollajenin yapıda varlığının katılımını saptamak amacıyla FTIR spektrofotometresi kullanıldı [357]. Yapılan analizde spektrofotometrede okunan dalga boyu hesaplanarak membranın dış tabakasında bulunan kollajenin membran yapısına katılmış olduğu bulgulanı.

Dişetinde bulunan temel bağ dokusu lifleri kollajen ve elastik liflerdir. Bağ dokusundaki kollajen lifler esas olarak tip I kollajenden oluşur ve dişeti dokusuna gerilme kuvveti kazandırır [2]. Bu kollajen lifler 100 ile 2000 nm arasında değişen nanolifler halinde bulunur [33]. Çalışmamızda örgüsüz (rastgele) homojen yapıdaki PCL-COL liflerinin SEM görüntüleri kullanılarak yapılan analizlerinde, bu liflerin ortalama çapının 625 ± 50 nm olduğu hesaplandı. Böylece PCL-COL dış tabakasının, bağ dokudaki doğal kollajen liflerin çapına ve dağılımına benzer bir yapı meydana getirerek bağ doku topografisini taklit ettiği gösterildi. Bu teknik sayesinde nano boyutlu lifler elde edilerek yüzey genişliğinin artması ile hücre tutunması ve hücrelerarası bağlantı sağlandığı görüldü. Diğer yandan PCL-COL dış tabaka dişeti epitel hücrelerinin gelişini kısıtlamak amacıyla tasarlandı. Bu yönde geliştirilen nanofibröz tabakadaki lifler sık ve rastgele dağıldığı için $50 \mu\text{m}$ boyutlarındaki epitel hücrelerinin geçişini kısıtlayabileceği düşünüldü [358].

rhBMP-7'nin salımını görmek amacıyla, membrana ait floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş proteinlerin ölçümünün yüksek hassasiyette ölçüm vermesi nedeniyle, FITC

boyama yöntemi ile salım çalışmaları yapıldı. Membranın rhBMP-7'nin salımını görmek için FITC ile işaretlenmiş PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranları hazırlandı. Etkinliği daha önce gösterilmiş olan bu yöntemi kullanarak membranın içerisinde boyanan rhBMP-7 moleküllerini daha sonra spektrofotometrede okuyarak sonuçları elde ettik [265]. Bu ölçümlerde oluşturduğumuz membranlardan ilk 4 saat sonunda BMP-7'nin ani salım (burst release) davranışı gösterdiği gözlemlendi. Bu ani patlama etkisiyle, yüklenen miktarın %42'sinin ortama salındığı görüldü. Ardından 2 saat daha devam eden bu etkinin azalarak 3 gün boyunca sürdüğü bulgulanı. Çalışmamıza benzer olarak PLGA matris yapısının yüzeyine yüklenen BMP-7'nin ilk 6 saatte ani patlama etkisi gösterdiği, buna karşın içerisinde yüklenen BMP-7'nin ise daha yavaş salım yaptığı bulgulanmıştır. BMP-7'nin ani salım yapmasının osteokondral defekt rejenerasyonunda etkili olduğu yapılan in vivo çalışma ile desteklenmiştir [359]. Ancak bugüne kadar BMP-7'nin nanofibröz PCL membrandan salımına dair bir çalışmaya literatürde rastlanmadığından elde ettiğimiz bulguları karşılaştırmamız mümkün olmadı.

Jo ve diğerleri (2015) BMP-2 emdirilerek elde edilen kollajen membranı, BMP-7'nin heparin ile bağlandığı diğer bir membranı ve BMP-2 ile BMP-7'nin beraber bulunduğu membranı karşılaştırdıkları çalışmada; her ikisinin beraber bulunduğu membranın, BMP-2'li membran ile aralarında az fark olmakla beraber daha fazla salım gösterdiği görülmüştür [360]. Bu çalışmada yer alan salım analizinde, BMP-7'nin heparin ile bağlanmasından dolayı ilk 1 saatte sadece %20,8'inin salındığını, salımın 28 güne kadar devam ettiğini bulgulanmışlardır. Araştırmacılar, içerisinde fiziksel olarak emdirilen BMP-2'nin ise %75'ini ilk saatte salındığını, kalanını ise 30 saate kadar devam ettirdiğini göstermişlerdir [360]. Bir diğer çalışmada PCL nanoliflerine heparinlenmiş olan FGF-2'nin 50 güne kadar salım yaptığı, heparinlenmemiş olarak yapılan membranda ise salımın 7 güne kadar düştüğü görülmüştür. Herhangi bir çapraz bağlayıcı kullanılmayarak BMP-7'yi yüklediğimiz bu çalışmada, BMP-7 salımının 3 günle sınırlı kaldığı bulgulanmıştır. Ancak yaygın olarak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan emdirme yöntemine göre ise kullandığımız yöntemin daha uzun süre BMP-7 salımı sağladığı gösterilmiştir [190].

Çalışmamızda membranın kök yüzeyine bakan tarafındaki BMP-7'nin nanofibröz tabakadaki liflerin üzerine etkileri SEM görüntüleri kullanarak incelendi. Elde ettiğimiz verilerde, 565 ± 40 nm olarak hesaplanan PCL-COL-BMP-7 nanofibröz membranların lif çapları, diğer gruplardaki PCL-COL nanofibröz membranların liflerinden daha ince

bulundu. Bu durum elektro-eğirme esnasında BMP-7 ile beraber hazırlanmış olan çözeltinin daha seyreltik olmasına yorumlandı. Çalışmamızda ortaya çıkan bu bulgu ile, membranın bu nanolif yapısının 300 nm boyutlara sahip periodontal ligament kollajen liflerine benzer olduğu görüldü [173].

Membranların in vitro ve in vivo uygulamalardan önce sterilize edilmesi gereklidir. Tıbbi sterilizasyon ürünlerinde en yaygın kullanılan yöntem Gamma radyasyonu ile sterilizasyondur [266]. Gamma radyasyonu etkinliğinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda tamamen kapatılarak paketlenen tıbbi malzemelerin sterilizasyonunda 25 kGy'in uygun olduğu bulunmuştur [267, 268, 361]. Çalışmamızda kullanılacak membranların sterilizasyonu tıbbi doz olarak kabul edilen 25 kGy gamma radyasyonu ile yapıldı [266]. Gamma radyasyonu PCL polimerinin mekanik özelliklerini etkileyerek materyaldeki stresi artırması ve materyalin degradasyonunu azaltması istenmeyen bazı durumlara neden olmaktadır. Ancak gamma radyasyonunun hücrelerin materyale tutunması ve çoğalması üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada bu ışımanın kondrositlere etkilemediği gösterilmiştir [267]. Biz de bu çalışma ile uyumlu olarak sterilize olan bu membranların MC3T3 hücre kültüründe herhangi bir kontaminasyon oluşturmadığını ve bu dozda sterilizasyonun hücrelerin tutunması ve çoğalmasını olumsuz etkilemediğini gözlemledik.

Doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılan kolayca tutunabilen, çoğalabilen ve farklılaşabilen MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücreleri, prototip membranların biyouyumluluğunu değerlendirmek üzere kullanıldı [175].

Çalışmamızda MC3T3 pre-osteoblast hücre kültürü membranlara ekilerek MTT testlerinde canlılıkları ve çoğalmaları incelendi. MTT testi mavi rengin yoğunlaşması ile hücrelerin canlılığını ve çoğaldığının bulgusunu gösteren kolorimetrik bir testtir. Hücre kültüründe bu mavi renk çözünmeyen formazan bileşiğine dönüşen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmaz. Formazan oluşumu yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür. Formazan oluşumunun tespiti mikropilaka okuyucu ile optik yoğunluğun ölçülmesi ile yapılır. MTT dışında hücrenin sitotoksitesini inceleyen MTS, XTT, WST-1 ve WST-8 gibi hassasiyeti daha yüksek yeni testler olmasına rağmen kemik doku mühendisliği çalışmalarında halen en yaygın olarak kullanılmakta olan test MTT testidir [355, 362-366].

MTT testleri ile hücrelerin membranların üzerindeki canlılıkları değerlendirilirken, bu membranların hücre kültürlerinde herhangi bir sitotoksik etki yaratmadığı görüldü. MTT testleri ile MC3T3 hücrelerinin çoğalmasını incelediğimizde üç, beş, yedi ve yirmi birinci günlerde hücrelerin PCL-nHA/PCL-COL membranın üzerinde PCL/PCL-COL membrana göre daha fazla çoğaldıkları bulguları (Şekil 4.4). Özellikle yedinci günde elde edilen bulgularda bu iki grup arasındaki fark daha yüksek bulundu ($p < 0,001$). Bu bulguya göre PCL-nHA/PCL-COL membranın pre-osteoblast hücrelerinin çoğalmasına, PCL/PCL-COL membrana göre daha fazla desteklediği saptandı. Çalışmamızın sonuçlarıyla benzerlik gösteren bir *in vitro* çalışmada nHA yapı ile periodontal ligament hücre ataşmanın olduğu, bu yapının osteoblast benzeri hücrelerin çoğalmasını indüklediği gösterilmiştir [367]. Aynı zamanda geleneksel mikro HA'ler ile karşılaştırıldığında nano HA yapıları osteoblast adezyonunun ve protein emiliminin daha fazla olduğu bulgulanmıştır [367]. Çalışmamızda da bu bulgulara paralel olarak membranın iskele yapısında bulunan nHA kristallerinin hücrelerin çoğalmasına katkı sağladığı gösterildi.

Çalışmamızda, membranların üzerine ekilen MC3T3 hücrelerinin morfolojisi, hücrelerarası etkileşimi ve hücrelerin göçünü gösteren yapıların varlığı SEM görüntüleri ile belirlendi. Pre-osteoblastik hücrelerin kontrol grubu olan PCL/PCL-COL membranın yüzeyine 4. günden itibaren tutundukları ve yayıldıkları görüldü (Bkz. Resim 4.9 a,e,f,g). Aynı zamanda hücrelerin liflere tutunup lifin yönüne doğru şekillerini verdikleri ve fibroblastik şekil olan iğsi formda oldukları gözlemlendi (Bkz. Resim 4.9 f). Böylece dişeti fibroblastlarının membranın dişeti bağ dokusuna bakacak yüzeyine tutunabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda hücresiz membrandan elde edilen yüzey ve kesit SEM görüntülerinde NaCl eklenmesi ile oluşturulması planlanan gözenekliliğe ulaşıldığı daha önce bahsedilmişti. Biz de hücreli olarak aldığımız SEM görüntülerinde nanoliflerin altından osteoblastların uzandığını tespit ettik (Bkz. Resim 4.10 f). SEM görüntülerinde iskele tabakasının 337 ± 172 μm aralığında tespit ettiğimiz gözenek boyutlarının, Oh ve diğerlerinin 380-405 μm gözenek genişliğinin osteoblastların gelişimine uygun olduğunu gördükleri çalışmayla uyumlu bulunmuştur [210]. Bir diğer çalışmada ise 480-500 μm olan gözenek genişliğine sahip PCL iskelenin fare kalvaryal defektlerine yerleştirildiğinde yeni kemik oluşumunu sağladığı bulgulanmıştır [343].

nHA'lı membranların SEM ile incelenmesinde, hücrelerin tüm günlerde membranın dış tabakasına tutunduğu, bazı yerlerde içeriye uzanarak çok katlı olarak çoğaldığı gözlemlendi (Bkz. Resim 4.10f-4.11f). 7. gün SEM görüntülerinde hücrelerin filopodyalarının nanofiblerin üzerinden uzandığı gösterildi (Bkz. Resim 4.10 d). PCL-nHA/PCL-COL grubunda 14. gün sonunda karakteristik olarak iğsi yapıdaki hücrelerin PCL fiberler üzerinde yayıldığı görüldü. Çalışmamız Wie ve Kim'in (2013) ipek ile beraber nHA kullandığı çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu bulunmuş, nHA varlığında pre-osteoblastların 7. günde çok katlı hale geldiği gösterilmiştir [368].

Araştırmamızda SEM analizinde nHA'lı membranın hücre canlılığına ya da morfolojisi üzerine hiçbir olumsuz etkisi gözlenmedi. Kültürün 7. gününde hücrelerin sitoplazmik uzantılarının membranın içerisindeki nHA tabakasına doğru üç boyutlu olarak yönlendikleri görüldü (Bkz. Resim 4.10-4.11). Kültürün 14. günündeki SEM görüntülerinde, PCL-nHA/PCL-COL membranda hücrelerin fibroblastik iğsi yapılarından osteoblastik fenotipe döndüklerini bulgulandı (Bkz. Resim 4.11.d). Ayrıca 14. gün 40 000 büyütme PCL-nHA/PCL-COL membranda hücrelerin farklılaşmanın bulgusu olan hidroksiapatit kristallerin oluştuğu gözlemlendi (Bkz. Resim 4.11 f). Böylece nHA yapı varlığının sadece hücrelerde osteokondüktif etki yaratmazken aynı zamanda farklılaşmayı indükleyici görev aldıkları gösterildi. Benzer çalışmalarda hücrelerin nHA varlığında farklılaşmaya eğilim göstermesi bulgularımızla paralellik göstermektedir [354].

Zhu ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmada nHA'yı titanyum ile birleştirmiş, yapının MC3T3 hücrelerine tutunmasını ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Araştırmacılar, hücrelerin çoğalmasında nHA'yı etkili bulmazken, geçirimli elektron mikroskop (TEM) analizinde ise nHA içeren titanyum yüzeyde hücrelerin migrasyonunu gösteren filopodya ve lamelliopodyaların daha çok bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuç nHA'lı titanyum yapının saf titanyum yapısına göre kemik doku ile daha iyi tutunduğunu ortaya koymuştur [369]. Biz de membranın içerisinde bulunan nHA yapıları sayesinde osteoblast hücrelerinin bu boşluklar içerisinde çoğalabileceğini gösterdik. Çalışmamızda nHA eklenerek üç fazlı oluşturulan bu membranın, dış tabakasının rezorpsiyonu sonrasında iskele tabakasındaki nHA'lı yapılara osteoblastların gelişiminin sağlanabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamıza benzer bir membran üreten Wu ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada, COL ve PCL kullanarak oluşturdukları iskelenin biyouyumluluğunu periodontal ligament hücre

kültürlerinde incelemişler ve nHA'nın etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada iskelenin hücre kültürü sonrası elde edilen SEM görüntülerinde iğsi formdaki periodontal ligament hücrelerinin filopodyalar ile yayıldığı ve liflerin arasını doldurdıkları gösterilmiştir. Ayrıca periodontal ligament hücre kültürlerinde RT-PCR ile analizi sonucunda COL-PCL-nHA iskelenin nHA içermeyen iskeleye göre ALP ve OC gibi osteojenik belirteçlerin daha yüksek bulunduğunu saptamışlardır. Böylece bu iskele yapısının periodontal doku mühendisliği için kullanılabilceğini belirtmişlerdir [33].

Doku mühendisliği alanında kullanılmak üzere oluşturulan PCL, COL, HA'nın birarada hibrid olarak sentezlendiği çalışmalar mevcuttur [69, 72, 370-372]. Ancak, aynı içerikte tabakaları hiyerarşik olarak görev alan ya da sementogenezi indüklemek üzere büyüme faktörü içeren multifonksiyonel bir membran tasarımına literatürde rastlanmamıştır.

Araştırmamızda, hücrelerin canlılık ve çoğalmalarını incelediğimiz MTT analizlerinde, PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda PCL/PCL-COL grubuna göre birinci gün hariç tüm günlerde anlamlı olarak hızlı bir yükselme gözlemlendi. Aynı grup PCL-nHA/PCL-COL grubu ile karşılaştırıldığında ise beşinci ($p<0,05$), yedinci ($p<0,01$) ve ondördüncü günlerde ($p<0,001$) mitotik aktivitelerinin arttığı bulgulanı. Hakkı ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada BMP-7'nin periodontal ligament hücrelerini ancak 24. ve 48. saat sonunda artırdığı bulgulanmıştır [252]. Biz de bu bulgulara benzer olarak çalışmamızda BMP-7'nin hücreler üzerinde ilk 24 saatte etkisiz kaldığını, ancak 72. saatte hücrelerin çoğalmasını sağladığını bulguladık. Böylece MTT sonuçlarını genel olarak değerlendirdiğimizde, nHA varlığının MC3T3 hücrelerinin çoğalmasını 14. güne kadar artırdığını, membrana BMP-7 eklenmesiyle bu etkinin 21 güne kadar sürdüğünü, böylece membranlara eklenen HA ve BMP-7'nin, pre-osteoblastlar üzerinde çoğalmayı indükleyici etki yarattığını gözledik.

Alveol kemiğin ECM'sini oluşturan organik matriksten salınan gen ekspresyonlarını ve ALP enzimini inceleyerek membranın osteojenik kapasitesini incelemeyi hedefledik. Alveol kemiğin %90'ı tip I kollajenden, geri kalan kollajen olmayan yapılar ise osteokalsin, osteonektin, kemik morfojenik proteinleri, kemik sialoprotein, osteopontin, fosfoprotein ve proteoglikanlardan oluşur. Kemik yapımının aktif olduğu dönemde osteoblastlar yüksek düzeyde ALP enzimi salgırlar ve bu enzim kanda yükselir. Bu da kemik mineralizasyonunu sağlar [2].

Hücre farklılaşmasının tayini için ALP analizi en sık kullanılan yöntemlerdendir. ALP enzimi alkali ortamda fosfatı hidrolize eden bir moleküldür [373]. ALP'lerin görevi kalsiyumu organik matriks içerisine yerleştirirken kollajen liflerin de oluşmasını sağlamaktır. Kemik oluşumunda kalsiyum, osteoblastların oluşturduğu osteoid yapının içerisine çökerek organik matriksi sertleştirir. Bu sırada osteoblastlar sitoplazma içinde ALP enzimi üreterek bu enzimi dışarı salarlar. Biriken bu enzim doku sıvılarıyla taşınan fosforik asit esterlerini hidrolize ederek fosfat oluştururlar. Böylece kalsiyum iyonları fosfat ile birleşerek matriks mineralizasyonu sağlar [374].

Çalışmamızda, kültürün 7. gününde sadece PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda hücrelerin ALP aktivitesi her iki gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Bkz. Şekil 4.5). Bu sonuçlara göre nHA'nın ALP aktivitesinde etkili olmadığı görüldü. Kültürün 14. gününde ise ALP aktivitesinin tüm membranlarda en yüksek değere ulaştığı, en çok aktivitenin PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda olduğu gözlemlendi. Kültürün 21. gününde ise ALP aktivitesi tüm gruplarda düşerek, en yüksek değer BMP-7 varlığında görülse de diğer gruplar ile arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamız ile benzer sonuçlar elde eden Yazid ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada MC3T3 hücre kültüründe osteoblast farklılaşması sırasında ALP aktivitesinin kültürün 14. gününe kadar devam ederek yükseldiğini bulgulamışlardır [375]. Zhang ve diğerleri (2015) adPDGF ve adBMP-7 içeren porözlü biyocam ve ipek iskelenin etkinliklerini periodontal ligament hücre kültüründe değerlendirdikleri çalışmalarında ise, çalışmamıza benzer olarak adBMP7 içeren iskelenin ALP aktivitesinin kültürün 14. gününde en yüksek seviyeye ulaştığını belirtmişlerdir [48]. Böylece osteoblast kültüründe nHA içeren membranlarda içermeyen membranlarla karşılaştırıldığında, ALP seviyesi bakımından gruplararası bir farklılık saptanmamıştır. Ancak BMP-7 eklenmiş membranlarda ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında tüm günlerde ALP seviyesi daha yüksek bulunmuştur.

Gerçek zamanlı RT-qPCR, DNA'nın çoğalması ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç veren bir yöntemdir. Bu yöntem kullanılarak, pre-osteoblast hücrelerinin farklılaşma ortamında pek çok genin ekspresyonunda değişiklikler meydana getirdiği gösterildi. Kemiğin ECM mineralizasyonu ve osteoblast fonksiyonun düzenlenmesi sırasında tip I kollajen, OPN, ALP ve OCN'nin yüksek olması doğrudan osteoblastın farklılaşmasını gösteren bulgulardır [179, 376-378]. Runx2 osteoblastik farklılaşmada yer alan ilk transkripsiyon faktörüdür ve osteoblastik fenotipteki pek çok geni

düzenleyen ana moleküldür [379]. Runx2 osteoblasta bağlanarak kemiğe özgü ALP, OCN ve OPN gibi genlerden mRNA salımını aktive eder ve osteoblast fenotipinin ortaya çıkmasını sağlar [380-382]. Bu transkripsiyon faktörü Runx2 (Cbfa1/AML3/PeBP2 α A)'nin osteoblastın erken farklılaşma dönemlerinde ECM proteinlerinin salımını başlatırken, osteoblast olgunlaşması sırasında gerekli olmadığı için salım seviyeleri azalır [379]. MC3T3 hücrelerinin Runx2 salım seviyelerine bakıldığında kültürün 7. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranda PCL/PCL-COL membrana göre 3.5 kat, PCL-nHA/PCL-COL membrana göre ise 2 kat fazla salındığı bulgulanmıştır. Kültürün 14. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranda diğer iki gruba göre anlamlı derecede salım seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Kültürün 21. gününde ise osteoblastik farklılaşmada düzenleyici rol oynayan Runx2'nin düşüş göstermesi erken dönem bulgusu olduğunu ve BMP-7'nin osteoblastik farklılaşmayı desteklediği sonucuna varıldı (Bkz. Şekil 4.7). Gu ve diğerleri (2004) C2C12 fare myoblast hücrelerinin BMP-7 tedavisi sonucu osteoblastik farklılaşmalarını Runx2 ile inceledikleri çalışmada, Runx2'nin BMP-7'li grupta ilk 24 saatte 6 katı, 6 gün boyunca ise 2 katı kadar daha fazla salındığını bulgulamışlardır [383]. Bu bulgu çalışmamızdaki erken osteoblastik farklılaşma belirtecinin kültürün 7. gününde BMP-7'li grupta 2 kat daha fazla salım sağlaması ile benzer bulunmuştur. Ancak elde ettiğimiz bulgularda nHA yapının Runx2 salımında artış sağlasa da, bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Osteoblastların fonksiyonlarından biri kollajen sentezidir. Osteoblastlar, kemik matriksinin organik kısmını yani kemiğin mekanik dayanıklılığını sağlayan kollajen lifleri ve glikozaminoglikanları salgırlar [104]. Bu nedenle BMP-7'nin membrandaki tip I kollajen aktivitesine etkisini incelediğimizde kültürün 7. günde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda her iki gruba göre istatistiksel olarak yüksek bulundu (Bkz. Şekil 4.6). Diğer yandan nHA'nın etkinliğini değerlendirdiğimizde nHA'nın kültürün 14. gününde PCL-nHA/PCL-COL membranında PCL/PCL-COL membrana göre belirgin olarak yükseldiği, böylece nHA'nın PCL yapısına katılmasının tip I kollajeni artırdığı gösterilmiştir. Kültürün 14. gününde tip I kollajen aktivitesinin tüm membranlarda en yüksek değere ulaştığı gruplar içinde en fazla PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 grubunda olduğu görüldü. Hakkı ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada, BMP-7'nin periodontal ligament kök hücrelerinde tip I kollajen aktivitesini ilk 10 günde artırırken, sonraki örnekleme döneminde 10. güne göre artırmadığını bulgulamışlardır [252]. Bu çalışmanın bulguları ile çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle paralellik göstermiştir. Çalışmamızda kültürün 21. gününde tip I kollajen düzeylerinin diğer günlere göre tüm gruplarda azaldığı bulgulanmıştır. Bu sonuçlar tip I

kollajenin erken dönem bulgusu olduğunu ve BMP-7'nin kültürün ilk 14 gününde etkili olduğunu gösterdi.

Osteopontin (OPN) kemik ve sement yapısında bulunan kollajen olmayan bir diğer farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkan ECM proteinlerdendir [384, 385]. OPN kemik hücrelerinin tutunmasını, osteoklast fonksiyonunu düzenlemeyi, kemiğin mineralizasyonunu sağlar [376, 386]. Çalışmamızda OPN'nin kültürün 7. gününde membranlardan salımı incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.9). Kültürün 14. gününde ise OPN'nin diğer membranlara göre PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranından belirgin olarak daha fazla salındığı gösterildi ($p < 0,01$). OPN salım düzeyinin kültürün 21. gününde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranda diğer iki membrana göre yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlendi. Bu bulgu Hakkı ve diğerlerinin (2014) yaptıkları çalışma ile uyumlu bulundu [252]. Bu sonuçlardan yola çıkarak BMP-7 varlığının tüm günlerde OPN'nin salım seviyesinde artış sağladığı bulgularlandı. Aynı zamanda yapılan çalışmalarla uyumlu olarak OPN'nin tüm gruplarda 21. günde artış göstermesi nedeniyle OPN'nin geç dönem farklılaşma belirteci olduğu bulgularımızla uyumlu bulundu [387].

Kollajen olmayan ECM proteinlerinin başında gelen osteokalsin (GLA protein-OCN), olgun osteoblastın geç dönemlerinde ortaya çıkar. OCN, kemik matriks mineralizasyonu ya da hidroksiapatit kristallerin büyümesini etkiler, dişte ise sellüler sementte lokalize olarak görülür [104]. Çalışmamızda OCN salımında, pre-osteoblast hücre kültüründe 7. günde PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membrandaki salım değerleri, diğer iki membrana göre 2.7 kat arttığı gözlemlendi. Kültürün 14. gününde salınan OCN miktarı incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü. Kültürün 21. gününde ise OCN'nin PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranında diğer iki membrana göre yaklaşık 2.5 katı kadar daha fazla salındığı bulgularlandı (Bkz. Şekil 4.8). BMP-7'nin osteoblastik farklılaşmada etkili olması, ancak iskele içerisinde bulunan n-HA'nın bu farklılaşmaya katkıda bulunmaması diğer osteojenik belirteçlerle paralellik gösterdi.

Chen ve diğerleri (2012) MC3T3 hücrelerini kitosan/nHA/kollajen iskeleye ekerek osteoblastik farklılaşmalarını değerlendirdikleri çalışmada, OCN, Runx2 ve tip I kollajen salım miktarını kitosan ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar bu belirteçlerin 7. ve 10. günlerde anlamlı olarak arttığını, böylece nHA'nın kitosana eklenmesinin farklılaşmayı indüklediğini bulgularlamışlardır. Araştırmacılar bu belirteçlerden yola çıkarak nHA'nın

kalsiyum fosfat yapısının, kültür ortamı içerisinde çözündükçe apatit oluşumunu başlattığını, bu doğal apatit yapısının osteoblast farklılaşmasını ve mineralizasyonunu hızlandırabileceğini belirtmişlerdir [388].

Çalışmamızdaki SEM görüntülerinde elde ettiğimiz görüntülerde de nHA yapının kristal yapı oluşturduğu gözleendiği için bu yapının mineralizasyona katkı sağladığı düşünülebilir. Ancak hücrelerden ECM sentezini gösteren belirteçlere bakıldığında ise nHA yapının sadece tip I kollajen seviyesinde anlamlı olarak artış yarattığı, nHA'nın Runx2 ve OCN'de de artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç dış tabakalardaki nanoliflerin varlığı nedeniyle hücrelerin erken dönemde orta tabakadaki nHA yapıya ulaşamadığını ve bu nedenle nHA'ların ECM proteinlerinin üretimini indükleyemediğini göstermiştir.

Özetleyecek olursak, hazırlanan bu üç fazlı membranların fiziksel, kimyasal ve biyoyumluluk testleri ile incelendiğinde, kök yüzeyine bakan iç yüzeylerini ve dişetine bakan dış yüzeylerini kaplayan PCL-COL nanofibröz yapılara hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir. PCL-COL nanoliflerinin hem periodontal ligament hem de dişeti kollajenlerinin topografisine benzediği bulgulanmıştır. Böylece dişetine yerleştirilen bu membranın biyoyumlu olduğunu gösterdik.

Membranın orta tabakası incelendiğinde ise gözenekli ve nano boyutlu yapısının osteoblastların üremesi ve farklılaşması için uygun olduğu, seçilen materyallerin kemiğin ECM'sinde bulunan proteinleri arttırdığı izlendi. İskele tabakasında bulunan nHA yapının, çoğalma üzerinde etkin olduğu ancak farklılaşma belirteçlerinden tip I kollajen dışında anlamlı bir farklılık yaratmadığı gözleendi. Bu durum membranın dış tabakasının nanoliflerinin örgüsüz ve sık yapısına ve in vitro şartlarda membranın enzimatik degradasyona uğramamasına bağlı olabilir. Bu nedenle membranın iç tabakasındaki nHA yapısının açığa çıkamadığı ve hücrelerin nHA'lara ulaşamadığı düşünülmüştür. Böylece hücreler nHA yapıdan yeterli uyarıyı alamamıştır.

rhBMP-7'nin ise, pre-osteoblastik hücreler üzerinde çoğalmayı ve osteoblastik farklılaşmayı gösteren Runx2, tip I kollajen, OPN ve OCN belirteçlerini anlamlı olarak arttırdığı gösterildi.

Bu membranların fiziksel ve mekanik özelliklerinden dolayı biyouyumlu olduğu, membrana katılan BMP-7'nin rejeneratif etkiyi artırdığı sonucuna ulaştık.

6. SONUÇLAR

1. Doku mühendisliği prensiplerinden yola çıkarak periodontal doku iyileşmesinde her bir katmanı hiyerarşik sırayla görev görecek üç fazlı bir membran üretmeyi planladık. ECM yapısının görevlerini yerine getiren, epitel ve bağ dokunun bölgeye ilerlemesini engelleyen, osteogenez ve sementogenezi indükleyen bu “prototip membran” PCL/PCL-COL, PCL-nHA/PCL-COL ve PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 olarak adlandırdığımız üç farklı yapıda üretildi.
2. Üç fazlı olarak üretilen bu prototip membranların yapısı ve mekanik dayanıklılığı bakımından hücre tutunması, üremesi ve çoğalması için uygun olduğu bulundu. Prototip membranların gözenekli yapılarının ve içsel bağlantılarının osteoblastların geçişini sağlayacak nitelikte olduğu gözlemlendi.
3. Dişeti epitel hücrelerinin gelişini kısıtlamak amacıyla tasarlanan dış tabakadaki PCL-COL liflerinin nano boyutta olduğu ve rastgele dağıldığı gösterildi, diğer yandan nanoliflerle hazırlanmış bu tabakanın MC3T3 hücrelerinin tutunmasında, üremesinde ve farklılaşmasında etkin rol oynadığı bulgulandı.
4. PCL-nHA/PCL-COL membranın içerisine katılan nano boyuttaki HA yapısının fiziksel ve kimyasal olarak doğal kemik yapısına benzediği gösterildi. PCL ve nHA yapısındaki bu membran, periodontal rejenerasyonda rol oynayan mezenkim kaynaklı pre-osteoblast MC3T3 hücrelerinin çoğalmalarını sağladığı, farklılaşma belirteçlerinden ise sadece tip I kollajeni artırdığı bulundu.
5. PCL-nHA/PCL-COL-BMP-7 membranın BMP-7 salımı değerlendirildiğinde, ilk 4 saatte %42'sinin salındığını, 3 güne kadar salımının devam ettiği görüldü. Böylece membranın içerisindeki rhBMP-7'nin MC3T3 hücrelerinin tutunması, üremesi ve Runx2, tip I kollajen, OCN, OPN gibi farklılaşma belirteçlerinin salımında etkili bir biyosinyal molekül olduğu gözlemlendi.
6. Her bir katmanı hiyerarşik olarak görevlerini yerine getirmesi amacıyla bu yapıda ilk kez üretilen membranlardan hücrelerin tutunması, üremesi ve ECM üretimine bakılarak BMP-7 ve nHA içeren membranın periodontal rejenerasyonda etkin bir membran olabileceği düşünüldü. Bu membranın in vivo olarak periodontal defektlerdeki uygulanabilirliğinin anlaşılabilmesi için histopatolojik ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Bartold, P.M., McCulloch, C.A., Narayanan, A.S. and Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24, 253-269.
2. Newman MG, T.H., Klokkevold PR, Carranza FA (2009). The Normal Periodontium. In Carranza's Clinical Periodontology, 10th Edition, N. MG, ed. (Philadelphia, USA: Saunders), 46-67.
3. Newman MG, T.H., Klokkevold PR, Carranza FA (2009). Epidemiology of Gingival and Periodontal Disease. In Carranza's Clinical Periodontology, 10 Edition, N. MG, ed. (Philadelphia: Saunders), 115-133.
4. Mc. Donnell H.T. and MP., M. (2004). Principles and Practice of Periodontal Surgery. In Periodontics Medicine, Surgery and Implants, Rose LFM. BL., eds. (Philadelphia, USA: Elsevier Mosby), 358-404.
5. Melcher, A.H. (1976). On the repair potential of periodontal tissues. *Journal of Periodontology*, 47, 256-260.
6. Caffesse, R.G., Smith, B.A., Castelli, W.A. and Nasjleti, C.E. (1988). New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *Journal of Periodontology*, 59, 589-594.
7. Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J. (1986). New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *Journal of Clinical Periodontology*, 13, 604-616.
8. Nyman, S., Gottlow, J., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J. (1987). New attachment formation by guided tissue regeneration. *Journal of Periodontal Research*, 22, 252-254.
9. McAllister, B.S. and Haghghat, K. (2007). Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*, 78, 377-396.
10. Karring, T., Nyman, S., Gottlow, J. and Laurell, L. (1993). Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontology 2000*, 1, 26-35.
11. Cortellini, P. (2012). Minimally invasive surgical techniques in periodontal regeneration. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 12, 89-100.
12. Tonetti, M.S., Prato, G.P. and Cortellini, P. (1996). Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery. *Journal of Clinical Periodontology*, 23, 548-556.

13. Needleman, I.G., Worthington, H.V., Giedrys-Leeper, E. and Tucker, R.J. (2006). Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Systematic Reviews*, Cd001724.
14. McClain, P.K. and Schallhorn, R.G. (2000). Focus on furcation defects--guided tissue regeneration in combination with bone grafting. *Periodontology 2000*, 22, 190-212.
15. Hammerle, C.H. and Jung, R.E. (2003). Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontology 2000*, 33, 36-53.
16. Ramseier, C.A., Rasperini, G., Batia, S. and Giannobile, W.V. (2012). Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontology 2000*, 59, 185-202.
17. Lindhe, J. ed. (2008). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, Volume volume 2, Fifth Edition (UK: Blackwell Yayıncılık).
18. Kao, R.T., Nares, S. and Reynolds, M.A. (2015). Periodontal regeneration - intrabony defects: a systematic review from the AAP regeneration workshop. *Journal of Periodontology*, 86, S77-S104.
19. Cortellini, P. and Tonetti, M.S. (2015). Clinical concepts for regenerative therapy in intrabony defects. *Periodontology 2000*, 68, 282-307.
20. Sculean, A., Donos, N., Miliuskaite, A., Arweiler, N. and Brex, M. (2001). Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or bioabsorbable membranes. A 4-year follow-up split-mouth study. *Journal of Periodontology*, 72, 1695-1701.
21. Stavropoulos, A. and Karring, T. (2010). Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss) in the treatment of intrabony periodontal defects: 6-year results from a randomized-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 37, 200-210.
22. Stavropoulos, A., Karring, E.S., Kostopoulos, L. and Karring, T. (2003). Deproteinized bovine bone and gentamicin as an adjunct to GTR in the treatment of intrabony defects: a randomized controlled clinical study. *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 486-495.
23. Elharar, F., Rodriguez, H.J., Benque, E.P. and Caffesse, R.G. (1998). Guided tissue regeneration with bioabsorbable and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes in the treatment of naturally occurring periodontal defects in dogs. *Journal of Periodontology*, 69, 1218-1228.
24. Cheng, C.F., Wu, K.M., Chen, Y.T. and Hung, S.L. (2015). Bacterial adhesion to antibiotic-loaded guided tissue regeneration membranes - A scanning electron microscopy study. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114, 35-45.
25. Cortellini, P., Nieri, M., Prato, G.P. and Tonetti, M.S. (2008). Single minimally invasive surgical technique with an enamel matrix derivative to treat multiple

- adjacent intra-bony defects: clinical outcomes and patient morbidity. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 605-613.
26. Sood, S., Gupta, S. and Mahendra, A. (2012). Gene therapy with growth factors for periodontal tissue engineering--a review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 17, e301-310.
 27. Park, Y.J., Nam, K.H., Ha, S.J., Pai, C.M., Chung, C.P. and Lee, S.J. (1997). Porous poly(l-lactide) membranes for guided tissue regeneration and controlled drug delivery: membrane fabrication and characterization. *Journal of Controlled Release*, 43, 151-160.
 28. Gandhimathi, C., Venugopal, J.R., Bhaarithy, V., Ramakrishna, S. and Kumar, S.D. (2014). Biocomposite nanofibrous strategies for the controlled release of biomolecules for skin tissue regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4709-4722.
 29. Bao, M., Lou, X., Zhou, Q., Dong, W., Yuan, H. and Zhang, Y. (2014). Electrospun biomimetic fibrous scaffold from shape memory polymer of PDLLA-co-TMC for bone tissue engineering. *ACS Appliances of Materials Interfaces*, 6, 2611-2621.
 30. Basile, M.A., d'Ayala, G.G., Malinconico, M., Laurienzo, P., Coudane, J., Nottelet, B., Ragione, F.D. and Oliva, A. (2015). Functionalized PCL/HA nanocomposites as microporous membranes for bone regeneration. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 48, 457-468.
 31. Fu, S., Ni, P., Wang, B., Chu, B., Zheng, L., Luo, F., Luo, J. and Qian, Z. (2012). Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 33, 4801-4809.
 32. Yeo, A., Cheok, C., Teoh, S.H., Zhang, Z.Y., Buser, D. and Bosshardt, D.D. (2012). Lateral ridge augmentation using a PCL-TCP scaffold in a clinically relevant but challenging micropig model. *Clinical Oral Implants Research*, 23, 1322-1332.
 33. Wu, X., Miao, L., Yao, Y., Wu, W., Liu, Y., Chen, X. and Sun, W. (2014). Electrospun fibrous scaffolds combined with nanoscale hydroxyapatite induce osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4135-4143.
 34. Shao, X.X., Hutmacher, D.W., Ho, S.T., Goh, J.C. and Lee, E.H. (2006). Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*, 27, 1071-1080.
 35. Martinez-Diaz, S., Garcia-Giralt, N., Lebourg, M., Gomez-Tejedor, J.A., Vila, G., Caceres, E., Benito, P., Pradas, M.M., Nogues, X., Ribelles, J.L. (2010). In vivo evaluation of 3-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits. *American Journal of Sports Medicine*, 38, 509-519.

36. Chung, E.J., Ju, H.W., Park, H.J. and Park, C.H. (2014). Three-layered scaffolds for artificial esophagus using poly(varepsilon-caprolactone) nanofibers and silk fibroin: An experimental study in a rat model. *Journal of Biomedical Materials Research A*.
37. Kai, D., Prabhakaran, M.P., Jin, G. and Ramakrishna, S. (2011). Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research B Appliances Biomaterials*, 98, 379-386.
38. Mafi, P., Hindocha, S., Mafi, R. and Khan, W.S. (2012). Evaluation of biological protein-based collagen scaffolds in cartilage and musculoskeletal tissue engineering- a systematic review of the literature. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7, 302-309.
39. Stevens, K.R., Schwartz, R.E., Ng, S., Shan, J. and Bhatia, S.N. (2014). Chapter 46 - Hepatic Tissue Engineering. In *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R.L.L. Vacanti, ed. (Boston: Academic Press), 951-986.
40. Kadakia, A., Keskar, V., Titushkin, I., Djalilian, A., Gemeinhart, R.A. and Cho, M. (2008). Hybrid superporous scaffolds: an application for cornea tissue engineering. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 36, 441-471.
41. Chung, Y.G., Algarrahi, K., Franck, D., Tu, D.D., Adam, R.M., Kaplan, D.L., Estrada, C.R., Jr. and Mauney, J.R. (2014). The use of bi-layer silk fibroin scaffolds and small intestinal submucosa matrices to support bladder tissue regeneration in a rat model of spinal cord injury. *Biomaterials*, 35, 7452-7459.
42. McHugh, K.J., Tao, S.L. and Saint-Geniez, M. (2014). Porous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for retinal pigment epithelium transplantation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55, 1754-1762.
43. Ercolani, E., Del Gaudio, C. and Bianco, A. (2013). Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
44. Wang, G., Hu, X., Lin, W., Dong, C. and Wu, H. (2011). Electrospun PLGA-silk fibroin-collagen nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Animal*, 47, 234-240.
45. Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, 920-926.
46. Chen, F.M., Wu, Z.F., Sun, H.H., Wu, H., Xin, S.N., Wang, Q.T., Dong, G.Y., Ma, Z.W., Huang, S., Zhang, Y.J. (2006). Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: a novel delivery concept. *International Journal of Pharmaceutics*, 307, 23-32.
47. Wikesjo, U.M., Xiropaidis, A.V., Thomson, R.C., Cook, A.D., Selvig, K.A. and Hardwick, W.R. (2003). Periodontal repair in dogs: space-providing ePTFE devices increase rhBMP-2/ACS-induced bone formation. *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 715-725.

48. Zhang, Y., Miron, R.J., Li, S., Shi, B., Sculean, A. and Cheng, X. (2015). Novel MesoPorous BioGlass/silk scaffold containing adPDGF-B and adBMP7 for the repair of periodontal defects in beagle dogs. *Journal of Clinical Periodontology*.
49. Iorio-Siciliano, V., Andreuccetti, G., Blasi, A., Matarasso, M., Sculean, A. and Salvi, G.E. (2014). Clinical Outcomes Following Regenerative Therapy of Non-Contained Intrabony Defects Using a Deproteinized Bovine Bone Mineral Combined With Either Enamel Matrix Derivative or Collagen Membrane. *Journal of Periodontology*, 1-14.
50. Belal, M.H., Watanabe, H., Ichinose, S. and Ishikawa, I. (2012). Effect of PDGF-BB combined with EDTA gel on adhesion and proliferation to the root surface. *Odontology*, 100, 206-214.
51. Nazareth, C.A. and Cury, P.R. (2011). Use of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in the treatment isolated Class I gingival recession of defects: a pilot study. *Journal of Periodontology*, 82, 700-707.
52. Vaquette, C., Fan, W., Xiao, Y., Hamlet, S., Hutmacher, D.W. and Ivanovski, S. (2012). A biphasic scaffold design combined with cell sheet technology for simultaneous regeneration of alveolar bone/periodontal ligament complex. *Biomaterials*, 33, 5560-5573.
53. Kim, J.H., Kim, M.K., Park, J.H., Won, J.E., Kim, T.H. and Kim, H.W. (2011). Performance of novel nanofibrous biopolymer membrane for guided bone regeneration within rat mandibular defect. *In Vivo*, 25, 589-595.
54. Akman, A.C., Tigli, R.S., Gumusderelioglu, M. and Nohutcu, R.M. (2010). bFGF-loaded HA-chitosan: a promising scaffold for periodontal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 92, 953-962.
55. Tobita, M. and Mizuno, H. (2013). Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma: the keys to functional periodontal tissue engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8, 400-406.
56. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Shi, S. (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PloS One*, 1, e79.
57. Liao, S., Watari, F., Zhu, Y., Uo, M., Akasaka, T., Wang, W., Xu, G. and Cui, F. (2007). The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro. *Dental Materials*, 23, 1120-1128.
58. Bottino, M.C., Thomas, V. and Janowski, G.M. (2011). A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. *Acta Biomaterialia*, 7, 216-224.
59. Yukna, R.A., Callan, D.P., Krauser, J.T., Evans, G.H., Aichelmann-Reidy, M.E., Moore, K., Cruz, R. and Scott, J.B. (1998). Multi-center clinical evaluation of

- combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of Periodontology*, 69, 655-663.
60. Chen, F.M., Shelton, R.M., Jin, Y. and Chapple, I.L. (2009). Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives. *Medicinal Research Reviews*, 29, 472-513.
 61. Kaigler, D., Cirelli, J.A. and Giannobile, W.V. (2006). Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. *Expert Opinion Drug Delivery*, 3, 647-662.
 62. Ripamonti, U. (2007). Recapitulating development: a template for periodontal tissue engineering. *Tissue Engineering*, 13, 51-71.
 63. Dogan, A., Ozdemir, A., Kubar, A. and Oygur, T. (2002). Assessment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog: a pilot study. *Tissue Engineering*, 8, 273-282.
 64. Dogan, A., Ozdemir, A., Kubar, A. and Oygur, T. (2003). Healing of artificial fenestration defects by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in a dog: a preliminary study. *Tissue Engineering*, 9, 1189-1196.
 65. Malekzadeh, R., Hollinger, J.O., Buck, D., Adams, D.F. and McAllister, B.S. (1998). Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *Journal of Periodontology*, 69, 1256-1262.
 66. Lang, H., Schuler, N. and Nolden, R. (1998). Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects--a study in minipigs. *Journal of Dental Research*, 77, 393-405.
 67. van Dijk, L.J., Schakenraad, J.M., van der Voort, H.M., Herkstroter, F.M. and Busscher, H.J. (1991). Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment. A pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 18, 196-199.
 68. Mossad, S.B., Longworth, D.L., Goormastic, M., Serkey, J.M., Keys, T.F. and Bolwell, B.J. (1996). Early infectious complications in autologous bone marrow transplantation: a review of 219 patients. *Bone Marrow Transplantation*, 18, 265-271.
 69. Catledge, S.A., Clem, W.C., Shrikishen, N., Chowdhury, S., Stanishevsky, A.V., Koopman, M. and Vohra, Y.K. (2007). An electrospun triphasic nanofibrous scaffold for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2, 142.
 70. Zeybek, B., Duman, M. and Şendemir Ürkmez, A. (2014). Electrospinning of nanofibrous polycaprolactone (PCL) and collagen blended polycaprolactone for wound dressing and tissue engineering. *Usak University Journal of Material Sciences*, 1, 121-134.

71. Lekovic, V. and Kenney, E.B. (1993). Guided tissue regeneration using calcium phosphate implants together with 4 different membranes. A study on furcations in dogs. *Journal of Periodontology*, 64, 1154-1156.
72. Prosecka, E., Rampichova, M., Litvinec, A., Tonar, Z., Kralickova, M., Vojtova, L., Kochova, P., Plencner, M., Buzgo, M., Mickova, A. (2014). Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research A*
73. Remya, K.R., Joseph, J., Mani, S., John, A., Varma, H.K. and Ramesh, P. (2013). Nanohydroxyapatite incorporated electrospun polycaprolactone/polycaprolactone-polyethyleneglycol-polycaprolactone blend scaffold for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, 1483-1494.
74. Bunyaratavej, P. and Wang, H.L. (2001). Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology*, 72, 215-229.
75. Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of Periodontology*, 63, 322-331.
76. Novak, J. (2009). Classification Of The Disease And The Conditions Affecting The Periodontium In *Carranza's Clinical Periodontology*, Onuncu Baskı, M. Newman; H. Takei, P. Klokkevold F. Carranza, eds. (Philadelphia: W.B. Saunders), 100-110.
77. Cortellini, P. and Tonetti, M.S. (2000). Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 22, 104-132.
78. Garrett, S. (1996). Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of Periodontology*, 1, 621-666.
79. Badersten, A., Nilveus, R. and Egelberg, J. (1981). Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 8, 57-72.
80. Carranza FA, T.H. (2009). Phase II Periodontal Therapy. In *Carranza's Clinical Periodontology*, T.H. Newman MG, Klokkevold PR, Carranza FA, ed. (Philadelphia: Saunders), 881-886.
81. Haffajee, A.D., Socransky, S.S. and Gunsolley, J.C. (2003). Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8, 115-181.
82. Haffajee, A.D., Torresyap, G. and Socransky, S.S. (2007). Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *Journal of Clinical Periodontology*, 34, 243-253.
83. Dentino, A., Lee, S., Mailhot, J. and Hefti, A.F. (2013). Principles of periodontology. *Periodontology 2000*, 61, 16-53.

84. Ochsenbein, C. and Ross, S. (1969). A reevaluation of osseous surgery. *Dental Clinics of North America*, 13, 87-102.
85. Sims TN, A.J. (2009). Resective Osseous Surgery. In *Carranza's Clinical Periodontology*, T.H. Newman MG, Klokkevold PR, Carranza FA, ed., 950-967.
86. Hamp, S.E., Nyman, S. and Lindhe, J. (1975). Periodontal treatment of multirrooted teeth. Results after 5 years. *Journal of Clinical Periodontology*, 2, 126-135.
87. McCulloch, C.A. (1993). Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology 2000*, 1, 16-25.
88. Polimeni, G., Xiropaidis, A.V. and Wikesjo, U.M. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology 2000*, 41, 30-47.
89. Wikesjo, U.M. and Selvig, K.A. (1999). Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology 2000*, 19, 21-39.
90. Carranza FA, T.H. (2009). Rationale for Periodontal Treatment. In *Carranza's Clinical Periodontology*, T.H. Newman MG, Klokkevold PR, Carranza FA, ed., 630-647.
91. Bartold, P.M. and Narayanan, A.S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40, 29-49.
92. Singer, A.J. and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 341, 738-746.
93. Clark, R.A. (1993). Biology of dermal wound repair. *Dermatologic Clinics*, 11, 647-666.
94. Doğan, A. (1988). Deneysel Periodontal Defektlerde Fibrin Yapıştırıcı Madde (Tissucol) ve Sitrik Asit Etkilerinin Değerlendirilmesi. Periodontoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi (Ankara: Gazi Üniversitesi).
95. Caton, J., Nyman, S. and Zander, H. (1980). Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *Journal of Clinical Periodontology*, 7, 224-231.
96. Listgarten, M.A. and Rosenberg, M.M. (1979). Histological Study of Repair Following New Attachment Procedures in Human Periodontal Lesions. *Journal of Periodontology*, 50, 333-344.
97. Barrington, E.P. (1981). An overview of periodontal surgical procedures. *Journal of Periodontology*, 52, 518-528.
98. Bartold, P.M., Xiao, Y., Lyngstaadas, S.P., Paine, M.L. and Snead, M.L. (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 41, 123-135.

99. Sykaras, N. and Opperman, L.A. (2003). Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science*, 45, 57-73.
100. Periodontology, A.A.P. (2001). Glossary of Periodontal Terms.
101. Greenstein, G. and Caton, J.G. (1993). Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 1, 36-45.
102. Position Paper (2001). Tissue Banking of Bone Allografts Used in Periodontal Regeneration. *Journal of Periodontology*, 72, 834-838.
103. Position Paper (2005). Periodontal Regeneration. *Journal of Periodontology*, 76, 1601-1622.
104. Lindhe, J. (2009). Bone as Tissue. In *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 86-107.
105. Brunsvold, M.A. and Mellonig, J.T. (1993). Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 1, 80-91.
106. Rosen, P.S., Reynolds, M.A. and Bowers, G.M. (2000). The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontology 2000*, 22, 88-103.
107. Nasr, H.F., Aichelmann-Reidy, M.E. and Yukna, R.A. (1999). Bone and bone substitutes. *Periodontology 2000*, 19, 74-86.
108. Schallhorn, R.G., Hiatt, W.H. and Boyce, W. (1970). Iliac transplants in periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 41, 566-580.
109. Urist, M.R. and Strates, B.S. (1971). Bone morphogenetic protein. *Journal of Dental Research*, 50, 1392-1406.
110. Urist, M.R. and Strates, B.S. (2009). The Classic: Bone Morphogenetic Protein. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 467, 3051-3062.
111. Lindhe, J., Lang, N.P. and Karring, T. (2009). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 2 Volumes, (Wiley).
112. Stahl, S.S., Slavkin, H.C., Yamada, L. and Levine, S. (1972). Speculations about Gingival Repair. *Journal of Periodontology*, 43, 395-402.
113. Pettersson, E.C. and Aukhii, I. (1986). Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *Journal of Periodontal Research*, 21, 543-552.
114. Mayfield, L., Soderholm, G., Norderyd, O. and Attstrom, R. (1998). Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment of intraosseous periodontal defects. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 707-714.

115. Wikesjo, U.M., Baker, P.J., Christersson, L.A., Genco, R.J., Lyall, R.M., Hic, S., DiFlorio, R.M. and Terranova, V.P. (1986). A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *Journal of Periodontal Research*, 21, 322-329.
116. Stahl, S.S. and Froum, S.J. (1977). Human Clinical and Histologic Repair Responses following the Use of Citric Acid in Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology*, 48, 261-266.
117. Polson, A.M. and Proye, M.P. (1983). Fibrin Linkage: A Precursor for New Attachment. *Journal of Periodontology*, 54, 141-147.
118. Kersten, B.G., Chamberlain, A.D., Khorsandi, S., Wikesjo, U.M., Selvig, K.A. and Nilveus, R.E. (1992). Healing of the intrabony periodontal lesion following root conditioning with citric acid and wound closure including an expanded PTFE membrane. *Journal of Periodontology*, 63, 876-882.
119. Caffesse, R.G., Kerry, G.J., Chaves, E.S., McLean, T.N., Morrison, E.C., Lopatin, D.E., Caffesse, E.R. and Stults, D.L. (1988). Clinical Evaluation of the Use of Citric Acid and Autologous Fibronectin in Periodontal Surgery. *Journal of Periodontology*, 59, 565-569.
120. Labahn, R., Fahrenbach, W.H., Clark, S.M., Lie, T. and Adams, D.F. (1992). Root Dentin Morphology After Different Modes of Citric Acid and Tetracycline Hydrochloride Conditioning. *Journal of Periodontology*, 63, 303-309.
121. Parashis, A.O. and Mitsis, F.J. (1993). Clinical evaluation of the effect of tetracycline root preparation on guided tissue regeneration in the treatment of Class II furcation defects. *Journal of Periodontology*, 64, 133-136.
122. Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J. (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *Journal of Clinical Periodontology*, 7, 96-105.
123. Karring, T., Nyman, S., Lindhe, J. and Sirirat, M. (1984). Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *Journal of Clinical Periodontology*, 11, 41-52.
124. Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S. (1980). Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *Journal of Clinical Periodontology*, 7, 394-401.
125. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. (1982). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 9, 290-296.
126. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. (1982). The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology*, 9, 257-265.

127. Karring, T., Isidor, F., Nyman, S. and Lindhe, J. (1985). New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *Journal of Clinical Periodontology*, 12, 51-60.
128. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. (1984). New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 11, 494-503.
129. Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T. and Egelberg, J. (1985). Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. *Journal of Periodontal Research*, 20, 201-208.
130. Lindhe, J., Nyman, S. and Karring, T. (1984). Connective tissue reattachment as related to presence or absence of alveolar bone. *Journal of Clinical Periodontology*, 11, 33-40.
131. Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M. and Nyman, S. (1987). Periodontal regeneration via selective cell repopulation. *Journal of Periodontology*, 58, 546-552.
132. Cortellini, P., Pini Prato, G. and Tonetti, M.S. (1996). Periodontal regeneration of human intrabony defects with bioresorbable membranes. A controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, 67, 217-223.
133. Lindhe, J., Lang, N.P. and Karring, T. (2009). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 5 Edition, (Wiley).
134. Rakhmatia, Y.D., Ayukawa, Y., Atsuta, I., Furuhashi, A. and Koyano, K. (2014). Fibroblast attachment onto novel titanium mesh membranes for guided bone regeneration. *Odontology*.
135. Rakhmatia, Y.D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A. and Koyano, K. (2013). Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research*, 57, 3-14.
136. Warrer, K. and Karring, T. (1992). Guided tissue regeneration combined with osseous grafting in suprabony periodontal lesions. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 19, 373-380.
137. Urban, I.A., Lozada, J.L., Jovanovic, S.A., Nagursky, H. and Nagy, K. (2014). Vertical ridge augmentation with titanium-reinforced, dense-PTFE membranes and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 19 patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 29, 185-193.
138. Canullo, L. and Sisti, A. (2010). Early implant loading after vertical ridge augmentation (VRA) using e-PTFE titanium-reinforced membrane and nano-structured hydroxyapatite: 2-year prospective study. *European Journal of Oral Implantology*, 3, 59-69.

139. Selvig, K.A., Kersten, B.G., Chamberlain, A.D., Wikesjo, U.M. and Nilveus, R.E. (1992). Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing. *Journal of Periodontology*, 63, 974-978.
140. Crump, T.B., Rivera-Hidalgo, F., Harrison, J.W., Williams, F.E. and Guo, I.Y. (1996). Influence of three membrane types on healing of bone defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 82, 365-374.
141. Lundgren, A.K., Sennerby, L. and Lundgren, D. (1998). Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 27, 135-140.
142. Bottino, M.C., Thomas, V., Schmidt, G., Vohra, Y.K., Chu, T.M., Kowolik, M.J. and Janowski, G.M. (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dental Materials*, 28, 703-721.
143. Lekovic, V., Camargo, P.M., Weinlaender, M., Kenney, E.B. and Vasilic, N. (2001). Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *Journal of Periodontology*, 72, 583-589.
144. Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G. and Agrawal, C.M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17, 93-102.
145. Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Herten, M., Sculean, A. and Becker, J. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, 16, 369-378.
146. Dai, N.T., Williamson, M.R., Khammo, N., Adams, E.F. and Coombes, A.G.A. (2004). Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. *Biomaterials*, 25, 4263-4271.
147. Zhang, Y.Z., Venugopal, J., Huang, Z.M., Lim, C.T. and Ramakrishna, S. (2005). Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts. *Biomacromolecules*, 6, 2583-2589.
148. Sculean, A., Stavropoulos, A., Windisch, P., Keglevich, T., Karring, T. and Gera, I. (2004). Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with a bovine-derived xenograft and guided tissue regeneration. *Clinical Oral Investigations*, 8, 70-74.
149. Tonetti, M.S., Cortellini, P., Lang, N.P., Suvan, J.E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmouis, I., Rasperini, G., Rossi, R. (2004). Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. A multicenter randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 31, 770-776.

150. Chen, Y.-T., Wang, H.-L., Lopatin, D.E., O'Neal, R. and MacNeil, R.L. (1997). Bacterial Adherence to Guided Tissue Regeneration Barrier Membranes Exposed to the Oral Environment. *Journal of Periodontology*, 68, 172-179.
151. Murphy, K.G. and Gunsolley, J.C. (2003). Guided Tissue Regeneration for the Treatment of Periodontal Infrabony and Furcation Defects. A Systematic Review. *Annals of Periodontology*, 8, 266-302.
152. Pretzl, B., Kim, T.S., Holle, R. and Eickholz, P. (2008). Long-term results of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers. IV. A case series of infrabony defects after 10 years. *Journal of Periodontology*, 79, 1491-1499.
153. Eickholz, P., Krigar, D.M., Kim, T.S., Reitmeir, P. and Rawlinson, A. (2007). Stability of clinical and radiographic results after guided tissue regeneration in infrabony defects. *Journal of Periodontology*, 78, 37-46.
154. Jepsen, S., Eberhard, J., Herrera, D. and Needleman, I. (2002). A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *Journal of Clinical Periodontology*, 29 Suppl 3, 103-116; discussion 160-102.
155. Ivanovski, S. (2009). Periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 54 Suppl 1, S118-128.
156. Bratthall, G., Soderholm, G., Neiderud, A.M., Kullendorff, B., Edwardsson, S. and Attstrom, R. (1998). Guided tissue regeneration in the treatment of human infrabony defects. Clinical, radiographical and microbiological results: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 908-914.
157. Pontoriero, R. and Lindhe, J. (1995). Guided tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molars. *Journal of Clinical Periodontology*, 22, 810-812.
158. Atala, A. and Lanza, R.P. (2002). *Methods of Tissue Engineering*, (Academic Press).
159. Nerem, R.M. and Sambanis, A. (1995). Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Engineering*, 1, 3-13.
160. Nerem, R.M. (1991). Cellular engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 19, 529-545.
161. National Institute of Health. Tissue Engineering. 2015-05-03. URL: <http://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/6YFSDzequ>) Son Erişim Tarihi: 2015-05-03.

162. Gümüşderelioğlu, M. (2007). Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji. *Bilim ve Teknik*, Özel sayı.
163. Galler, K.M., D'Souza, R.N.and Hartgerink, J.D. (2010). Biomaterials and their potential applications for dental tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 8730-8746.
164. Spector, M. (2008). Basic Principles of Scaffolds in Tissue Engineering. In *Tissue Engineering Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*, 2 Edition, S.M.E.N.M.W.-L.L. Lynch, ed., 26-36.
165. Chen, F.-M.and Shi, S. (2014). Chapter 72 - Periodontal Tissue Engineering. In *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R.L.L. Vacanti, ed. (Boston: Academic Press), 1507-1540.
166. Chen, F.M.and Jin, Y. (2010). Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 219-255.
167. Pagni, G., Kaigler, D., Rasperini, G., Avila-Ortiz, G., Bartel, R.and Giannobile, W.V. (2012). Bone Repair Cells for Craniofacial Regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 1310-1319.
168. Seong, J.M., Kim, B.C., Park, J.H., Kwon, I.K., Mantalaris, A.and Hwang, Y.S. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 5, 062001.
169. Salgado, A.J., Coutinho, O.P.and Reis, R.L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765.
170. Park, S.R., Oreffo, R.O.C.and Triffitt, J.T. (1999). Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone*, 24, 549-554.
171. Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H.and Kaneda, Y. (2007). Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 453-458.
172. Lei, M., Li, K., Li, B., Gao, L.N., Chen, F.M.and Jin, Y. (2014). Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*, 35, 6332-6343.
173. Garant, P.R. (2003). *Oral Cells and Tissues*. (Quintessence), pp. 195-238.
174. Ruediger, T., Berg, A., Guellmar, A., Rode, C., Schnabelrauch, M., Urbanek, A., Wagner, K., Wyrwa, R., Kinne, R.W.and Sigusch, B.W. (2012). Cytocompatibility of polymer-based periodontal bone substitutes in gingival fibroblast and MC3T3 osteoblast cell cultures. *Dental Materials*, 28, e239-249.

175. Akman, A.C., Seda Tıǧlı, R., Gümüřderelioǧlu, M. and Nohutcu, R.M. (2010). Bone Morphogenetic Protein-6-loaded Chitosan Scaffolds Enhance the Osteoblastic Characteristics of MC3T3-E1 Cells. *Artificial Organs*, 34, 65-74.
176. Pon-On, W., Charoenphandhu, N., Teerapornpuntakit, J., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N. and Tang, I.M. (2014). Mechanical properties, biological activity and protein controlled release by poly(vinyl alcohol)-bioglass/chitosan-collagen composite scaffolds: a bone tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 38, 63-72.
177. Morelli, T., Neiva, R., Nevins, M.L., McGuire, M.K., Scheyer, E.T., Oh, T.J., Braun, T.M., Nör, J.E., Bates, D. and Giannobile, W.V. (2011). Angiogenic Biomarkers and Healing of Living Cellular Constructs. *Journal of Dental Research*, 90, 456-462.
178. Zhao, M., Jin, Q., Berry, J.E., Nociti, F.H., Jr., Giannobile, W.V. and Somerman, M.J. (2004). Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *Journal of Periodontology*, 75, 154-161.
179. Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y. and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149-155.
180. Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P.M., Gronthos, S., Shi, S. and Wang, S. (2008). Periodontal Ligament Stem Cell-Mediated Treatment for Periodontitis in Miniature Swine. *Stem Cells*, 26, 1065-1073.
181. Yamato, M. and Okano, T. (2004). Cell sheet engineering. *Materials Today*, 7, 42-47.
182. Hasegawa, M., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. and Ishikawa, I. (2005). Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Engineering*, 11, 469-478.
183. Tsumanuma, Y., Iwata, T., Washio, K., Yoshida, T., Yamada, A., Takagi, R., Ohno, T., Lin, K., Yamato, M., Ishikawa, I. (2011). Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials*, 32, 5819-5825.
184. Mironov, V., Visconti, R.P., Kasyanov, V., Forgacs, G., Drake, C.J. and Markwald, R.R. (2009). Organ printing: Tissue spheroids as building blocks(). *Biomaterials*, 30, 2164-2174.
185. Burg, K.J.L., Porter, S. and Kellam, J.F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21, 2347-2359.
186. Burg, K.J.L., Inskeep, B. and Burg, T.C. (2014). Chapter 36 - Breast Tissue Engineering: Reconstruction Implants and Three-Dimensional Tissue Test Systems. In *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edition), R.L.L. Vacanti, ed. (Boston: Academic Press), 727-749.

187. Mehr, N.G., Li, X., Chen, G., Favis, B.D. and Hoemann, C.D. (2014). Pore size and LbL chitosan coating influence mesenchymal stem cell in vitro fibrosis and biomineralization in 3D porous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research A*
188. Hutmacher, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543.
189. Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J. and Boccaccini, A.R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 3413-3431.
190. Bessa, P.C., Casal, M. and Reis, R.L. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 81-96.
191. Shimauchi, H., Nemoto, E., Ishihata, H. and Shimomura, M. (2013). Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Japanese Dental Science Review*, 49, 118-130.
192. Ivanovski, S., Vaquette, C., Gronthos, S., Hutmacher, D.W. and Bartold, P.M. (2014). Multiphasic scaffolds for periodontal tissue engineering. *Journal of Dental Research*, 93, 1212-1221.
193. Silvestri, A., Boffito, M., Sartori, S. and Ciardelli, G. (2013). Biomimetic materials and scaffolds for myocardial tissue regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 13, 984-1019.
194. Fujisato, T., Sajiki, T., Liu, Q. and Ikada, Y. (1996). Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold. *Biomaterials*, 17, 155-162.
195. Lee, C.H., Shin, H.J., Cho, I.H., Kang, Y.M., Kim, I.A., Park, K.D. and Shin, J.W. (2005). Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials*, 26, 1261-1270.
196. Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. and Petite, H. (2005). Engineering bone: challenges and obstacles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 72-84.
197. Song, J.M., Shin, S.H., Kim, Y.D., Lee, J.Y., Baek, Y.J., Yoon, S.Y. and Kim, H.S. (2014). Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *International Journal of Oral Science*, 6, 87-93.
198. Rana, D., Arulkumar, S., Vishwakarma, A. and Ramalingam, M. (2015). Chapter 10 - Considerations on Designing Scaffold for Tissue Engineering. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, A.V.S.S. Ramalingam, ed. (Boston: Academic Press), 133-148.

199. Se Heang, O. and Jin Ho, L. (2013). Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility. *Biomedical Materials*, 8, 014101.
200. Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W. (2010). The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35, 1217-1256.
201. Tay, F.R., Pashley, D.H., Loushine, R.J., Kuttler, S., Garcia-Godoy, F., King, N.M. and Ferrari, M. (2007). Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. Evidence of biodegradation from a simulated field test. *American Journal of Dentistry*, 20, 365-369.
202. Lui, Y.S., Lewis, M.P. and Loo, S.C. (2015). Sustained-release of naproxen sodium from electrospun-aligned PLLA-PCL scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
203. Ebersole, G.C., Buettmann, E.G., MacEwan, M.R., Tang, M.E., Frisella, M.M., Matthews, B.D. and Deeken, C.R. (2012). Development of novel electrospun absorbable polycaprolactone (PCL) scaffolds for hernia repair applications. *Surgical Endoscopy*, 26, 2717-2728.
204. Tran, P.A., Hocking, D.M. and O'Connor, A.J. (2015). In situ formation of antimicrobial silver nanoparticles and the impregnation of hydrophobic polycaprolactone matrix for antimicrobial medical device applications. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 47, 63-69.
205. Han, H.S., Thambi, T., Choi, K.Y., Son, S., Ko, H., Lee, M.C., Jo, D.G., Chae, Y.S., Kang, Y.M., Lee, J.Y. (2015). Bioreducible shell-cross-linked hyaluronic acid nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Biomacromolecules*, 16, 447-456.
206. Yeo, A., Rai, B., Sju, E., Cheong, J.J. and Teoh, S.H. (2008). The degradation profile of novel, bioresorbable PCL–TCP scaffolds: An in vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A, 208-218.
207. Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. and Trehan, A. (2004). Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1-23.
208. Salgado, C.L., Sanchez, E.M., Zavaglia, C.A. and Granja, P.L. (2012). Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100, 243-251.
209. Kweon, H., Yoo, M.K., Park, I.K., Kim, T.H., Lee, H.C., Lee, H.-S., Oh, J.-S., Akaike, T. and Cho, C.-S. (2003). A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 801-808.
210. Oh, S.H., Park, I.K., Kim, J.M. and Lee, J.H. (2007). In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, 28, 1664-1671.

211. Costa, P.F., Vaquette, C., Zhang, Q., Reis, R.L., Ivanovski, S. and Hutmacher, D.W. (2014). Advanced tissue engineering scaffold design for regeneration of the complex hierarchical periodontal structure. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 283-294.
212. Dan, H., Vaquette, C., Fisher, A.G., Hamlet, S.M., Xiao, Y., Hutmacher, D.W. and Ivanovski, S. (2014). The influence of cellular source on periodontal regeneration using calcium phosphate coated polycaprolactone scaffold supported cell sheets. *Biomaterials*, 35, 113-122.
213. Pilipchuk, S.P., Plonka, A.B., Monje, A., Taut, A.D., Lanis, A., Kang, B. and Giannobile, W.V. (2015). Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental Materials*, 31, 317-338.
214. Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J. and Jannesari, M. (2010). Controlled release of metronidazole benzoate from poly epsilon-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, 179-185.
215. Reise, M., Wyrwa, R., Müller, U., Zylinski, M., Völpel, A., Schnabelrauch, M., Berg, A., Jandt, K.D., Watts, D.C. and Sigusch, B.W. (2012). Release of metronidazole from electrospun poly(l-lactide-co-d/l-lactide) fibers for local periodontitis treatment. *Dental Materials*, 28, 179-188.
216. Dai, N.-T., Yeh, M.-K., Chiang, C.-H., Chen, K.-C., Liu, T.-H., Feng, A.-C., Chao, L.-L., Shih, C.-M., Sytwu, H.-K., Chen, S.-L. (2009). Human single-donor composite skin substitutes based on collagen and polycaprolactone copolymer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386, 21-25.
217. Fujihara, K., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. (2005). Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*, 26, 4139-4147.
218. Mate Sanchez de Val, J.E., Calvo Guirado, J.L., Delgado Ruiz, R.A., Gomez Moreno, G., Ramirez Fernandez, M.P. and Romanos, G.E. (2014). Bone neoformation and mineral degradation of 4Bone. Part I: material characterization and SEM study in critical size defects in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*.
219. Heo, S.C., Shin, W.C., Lee, M.J., Kim, B.R., Jang, I.H., Choi, E.-J., Lee, J.S. and Kim, J.H. (2015). Periostin Accelerates Bone Healing Mediated by Human Mesenchymal Stem Cell-Embedded Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Scaffold. *PloS One*, 10, e0116698.
220. Hollister, S.J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4, 518-524.
221. Christenson, E.M., Anseth, K.S., van den Beucken, J.J., Chan, C.K., Ercan, B., Jansen, J.A., Laurencin, C.T., Li, W.J., Murugan, R. and Nair, L.S. (2007). Nanobiomaterial applications in orthopedics. *Journal of Orthopaedic Research*, 25, 11-22.

222. Huang, Z.-M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63, 2223-2253.
223. Lim, S.H. and Mao, H.-Q. (2009). Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1084-1096.
224. Park, J.B. and Bronzino, J.D. (2002). *Biomaterials: principles and applications*, (crc press).
225. Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S. and Roy, K. (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 215-228.
226. Mikos, A.G. and Temenoff, J.S. (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 23-24.
227. Yoshimoto, H., Shin, Y., Terai, H. and Vacanti, J. (2003). A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 2077-2082.
228. Liao, C.-J., Chen, C.-F., Chen, J.-H., Chiang, S.-F., Lin, Y.-J. and Chang, K.-Y. (2002). Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 676-681.
229. Cochran, D.L. and Wozney, J.M. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 19, 40-58.
230. Tada, S., Kitajima, T. and Ito, Y. (2012). Design and Synthesis of Binding Growth Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6053-6072.
231. Shimono, M., Ishikawa, T., Ishikawa, H., Matsuzaki, H., Hashimoto, S., Muramatsu, T., Shima, K., Matsuzaka, K.-I. and Inoue, T. (2003). Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microscopy Research and Technique*, 60, 491-502.
232. Murakami, S. (2011). Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontology 2000*, 56, 188-208.
233. Stavropoulos, A. and Wikesjo, U.M. (2012). Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: a review on factors with clinical testing. *Journal of Periodontal Research*, 47, 545-553.
234. Sculean, A., Kiss, A., Miliauskaite, A., Schwarz, F., Arweiler, N.B. and Hannig, M. (2008). Ten-year results following treatment of intra-bony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 817-824.

235. Esposito, M., Grusovin, M.G., Papanikolaou, N., Coulthard, P. and Worthington, H.V. (2009). Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd003875.
236. Takayama, S., Murakami, S., Shimabukuro, Y., Kitamura, M. and Okada, H. (2001). Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *Journal of Dental Research*, 80, 2075-2079.
237. Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M. and Kido, J. (2011). FGF-2 Stimulates Periodontal Regeneration Results of a Multi-center Randomized Clinical Trial. *Journal of Dental Research*, 90, 35-40.
238. Smith, P.C., Martínez, C., Cáceres, M. and Martínez, J. (2015). Research on growth factors in periodontology. *Periodontology 2000*, 67, 234-250.
239. Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150, 893-899.
240. Sampath, T.K. and Reddi, A.H. (1981). Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7599-7603.
241. Ripamonti, U. and Reddi, A.H. (1994). Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *Journal of Periodontal Research*, 29, 225-235.
242. Nakashima, M. and Reddi, A.H. (2003). The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 21, 1025-1032.
243. Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C. and Granjeiro, J.M. (2014). Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of Dental Research*, 93, 335-345.
244. Zhang, R., Xu, D., Landeryou, T., Toth, C., Dimaano, N., Berry, J., Evans, J. and Hawkins, M. (2004). Ectopic bone formation using osteogenic protein-1 carried by a solution precipitated hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71A, 412-418.
245. Pietrzak, W.S. and Ali, S.N. (2015). The extraction and measurement of bone morphogenetic protein 7 from bovine cortical bone as a function of particle size. *Journal of Craniofacial Surgery*, 26, 296-299.
246. Ripamonti, U. and Renton, L. (2006). Bone morphogenetic proteins and the induction of periodontal tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 41, 73-87.
247. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. and Bigham-Sadegh, A. (2014). Bone morphogenetic proteins: A powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *Biofactors*, 40, 459-481.

248. Yeh, L.C.C., Unda, R. and Lee, J.C. (2000). Osteogenic protein-1 differentially regulates the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in primary cultures of osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 185, 87-97.
249. Lallier, T. and Spencer, A. (2007). Use of microarrays to find novel regulators of periodontal ligament fibroblast differentiation. *Cell and Tissue Research*, 327, 93-109.
250. Hakki, S.S., Foster, B.L., Nagatomo, K.J., Bozkurt, S.B., Hakki, E.E., Somerman, M.J. and Nohutcu, R.M. (2010). Bone morphogenetic protein-7 enhances cementoblast function in vitro. *Journal of Periodontology*, 81, 1663-1674.
251. Bozic, D., Grgurevic, L., Erjavec, I., Brkljacic, J., Orlic, I., Razdorov, G., Grgurevic, I., Vukicevic, S. and Plancak, D. (2012). The proteome and gene expression profile of cementoblastic cells treated by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 80-90.
252. Hakki, S.S., Bozkurt, B., Hakki, E.E., Kayis, S.A., Turac, G., Yilmaz, I. and Karaoz, E. (2014). Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research B Appliances Biomaterials*, 102, 119-130.
253. Yeh, L.C., Ma, X., Matheny, R.W., Adamo, M.L. and Lee, J.C. (2010). Protein kinase D mediates the synergistic effects of BMP-7 and IGF-I on osteoblastic cell differentiation. *Growth Factors*, 28, 318-328.
254. Martinovic, S., Borovecki, F., Miljavac, V., Kistic, V., Maticic, D., Francetic, I. and Vukicevic, S. (2006). Requirement of a bone morphogenetic protein for the maintenance and stimulation of osteoblast differentiation. *Archives of Histology and Cytology*, 69, 23-36.
255. Ripamonti, U., Heliotis, M., Rueger, D.C. and Sampath, T.K. (1996). Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Archives of Oral Biology*, 41, 121-126.
256. Ripamonti, U., Crooks, J., Petit, J.C. and Rueger, D.C. (2001). Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *European Journal of Oral Sciences*, 109, 241-248.
257. Giannobile, W.V., Ryan, S., Shih, M.S., Su, D.L., Kaplan, P.L. and Chan, T.C. (1998). Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *Journal of Periodontology*, 69, 129-137.
258. Ripamonti, U., Ramoshebi, L.N., Matsaba, T., Tasker, J., Crooks, J. and Teare, J. (2001). Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 83, S116-S127.
259. Susin, C., Qahash, M., Polimeni, G., Lu, P.H., Prasad, H.S., Rohrer, M.D., Hall, J. and Wikesjö, U.M. (2010). Alveolar ridge augmentation using implants coated with

- recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): histological observations. *Journal of Clinical Periodontology*, 37, 574-581.
260. Simsek, M., Capkin, M., Karakeçili, A. and Gumusderelioglu, M. (2012). Chitosan and polycaprolactone membranes patterned via electrospinning: effect of underlying chemistry and pattern characteristics on epithelial/fibroblastic cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100, 3332-3343.
261. Cengiz, B., Gokce, Y., Yildiz, N., Aktas, Z. and Calimli, A. (2008). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322, 29-33.
262. Liao, C.J., Chen, C.F., Chen, J.H., Chiang, S.F., Lin, Y.J. and Chang, K.Y. (2002). Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 676-681.
263. Oh, S.H., Kang, S.G., Kim, E.S., Cho, S.H. and Lee, J.H. (2003). Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials*, 24, 4011-4021.
264. Zhang, S., Huang, Y., Yang, X., Mei, F., Ma, Q., Chen, G., Ryu, S. and Deng, X. (2009). Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 90, 671-679.
265. Soran, Z., Aydin, R.S. and Gumusderelioglu, M. (2012). Chitosan scaffolds with BMP-6 loaded alginate microspheres for periodontal tissue engineering. *Journal of Microencapsulation*, 29, 770-780.
266. Nguyen, H., Morgan, D.A. and Forwood, M.R. (2007). Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Bank*, 8, 81-91.
267. Cottam, E., Hukins, D.W., Lee, K., Hewitt, C. and Jenkins, M.J. (2009). Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. *Medical Engineering and Physics*, 31, 221-226.
268. Sintzel, M.B., Merkli, A., Tabatabay, C. and Gurny, R. (1997). Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers—A Review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23, 857-878.
269. Gumusderelioglu, M. and Aday, S. (2011). Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydrate Research*, 346, 606-613.
270. Gumusderelioglu, M., Dalkiranoglu, S., Aydin, R.S. and Cakmak, S. (2011). A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 98, 461-472.

271. McCauley, L.K., Koh, A.J., Beecher, C.A., Cui, Y., Decker, J.D. and Franceschi, R.T. (1995). Effects of differentiation and transforming growth factor beta 1 on PTH/PTHrP receptor mRNA levels in MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 1243-1255.
272. Elnar, A.A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A.K. and Soulimani, R. (2012). Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (summation operator 6 NDL-PCBs) in mice. *Toxicology*, 299, 44-54.
273. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
274. Bowers, G.M., Schallhorn, R.G. and Mellonig, J.T. (1982). Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *Journal of Periodontology*, 53, 509-514.
275. Caton, J.G. and Zander, H.A. (1979). The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. *Journal of Periodontology*, 50, 462-466.
276. Listgarten, M.A. and Rosenberg, M.M. (1979). Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *Journal of Periodontology*, 50, 333-344.
277. Caton, J. and Nyman, S. (1980). Histometric evaluation of periodontal surgery. I. The modified Widman flap procedure. *Journal of Clinical Periodontology*, 7, 212-223.
278. Chen, C.C., Wang, H.L., Smith, F., Glickman, G.N., Shyr, Y. and O'Neal, R.B. (1995). Evaluation of a collagen membrane with and without bone grafts in treating periodontal intrabony defects. *Journal of Periodontology*, 66, 838-847.
279. Mattson, J.S., Gallagher, S.J. and Jabro, M.H. (1999). The use of 2 bioabsorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. *Journal of Periodontology*, 70, 510-517.
280. Garrett, S., Gantes, B., Zimmerman, G. and Egelberg, J. (1994). Treatment of mandibular class III periodontal furcation defects. Coronally positioned flaps with and without expanded polytetrafluoroethylene membranes. *Journal of Periodontology*, 65, 592-597.
281. Reddy, M.S., Aichelmann-Reidy, M.E., Avila-Ortiz, G., Klokkevold, P.R., Murphy, K.G., Rosen, P.S., Schallhorn, R.G., Sculean, A. and Wang, H.L. (2015). Periodontal regeneration - furcation defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop. *Journal of Periodontology*, 86, S131-133.
282. Christgau, M., Schmalz, G., Wenzel, A. and Hiller, K.A. (1997). Periodontal regeneration of intrabony defects with resorbable and non-resorbable membranes: 30-month results. *Journal of Clinical Periodontology*, 24, 17-27.

283. Sculean, A., Nikolidakis, D., Nikou, G., Ivanovic, A., Chapple, I.L.C. and Stavropoulos, A. (2015). Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontology 2000*, 68, 182-216.
284. Shen, B., Wei, A., Whittaker, S., Williams, L.A., Tao, H., Ma, D.D. and Diwan, A.D. (2010). The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109, 406-416.
285. Bozic, D., Grgurevic, L., Erjavec, I., Razdorov, G., Brkljacic, J., Orlic, I. and Plancak, D. (2012). Effect of bone morphogenetic protein-7 on gene expression of bone morphogenetic protein-4, dentin matrix protein-1, insulin-like growth factor-I and -II in cementoblasts in vitro. *Collegium Antropologicum*, 36, 1265-1271.
286. Chen, F.M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F. and Wu, Z.F. (2010). A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*, 31, 7892-7927.
287. Chen, F.M., Ma, Z.W., Dong, G.Y. and Wu, Z.F. (2009). Composite glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin nanoparticles for localized protein delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 485-493.
288. Chen, F.-M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F. and Wu, Z.-F. (2010). A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*, 31, 7892-7927.
289. Lavery, K., Hawley, S., Swain, P., Rooney, R., Falb, D. and Alaoui-Ismaili, M.H. (2009). New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone*, 45, 27-41.
290. Chen, F.M., Zhao, Y.M., Zhang, R., Jin, T., Sun, H.H., Wu, Z.F. and Jin, Y. (2007). Periodontal regeneration using novel glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins. *Journal of Controlled Release*, 121, 81-90.
291. Kim, K.S., Kang, Y.M., Lee, J.Y., Kim, E.S., Kim, C.H., Min, B.H., Lee, H.B., Kim, J.H. and Kim, M.S. (2009). Injectable CMC/PEI gel as an in vivo scaffold for demineralized bone matrix. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 19, 381-390.
292. Sato, Y., Kikuchi, M., Ohata, N., Tamura, M. and Kuboki, Y. (2004). Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *Journal of Periodontology*, 75, 243-248.
293. Zeng, N., van Leeuwen, A., Yuan, H., Bos, R.R., Grijpma, D.W. and Kuijjer, R. (2014). Evaluation of novel resorbable membranes for bone augmentation in a rat model. *Clinical Oral Implants Research*.

294. Kim, Y.T., Wikesjo, U.M., Jung, U.W., Lee, J.S., Kim, T.G. and Kim, C.K. (2013). Comparison between a beta-tricalcium phosphate and an absorbable collagen sponge carrier technology for rhGDF-5-stimulated periodontal wound healing/regeneration. *Journal of Periodontology*, 84, 812-820.
295. Lee, J.J., Yu, H.S., Hong, S.J., Jeong, I., Jang, J.H. and Kim, H.W. (2009). Nanofibrous membrane of collagen-polycaprolactone for cell growth and tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1927-1935.
296. Vaquette, C. and Cooper-White, J. (2013). A simple method for fabricating 3-D multilayered composite scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 9, 4599-4608.
297. Miyaji, H., Sugaya, T., Kato, K., Kawamura, N., Tsuji, H. and Kawanami, M. (2006). Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *Journal of Periodontal Research*, 41, 311-315.
298. Miyaji, H., Sugaya, T., Ibe, K., Ishizuka, R., Tokunaga, K. and Kawanami, M. (2010). Root surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 facilitates cementum-like tissue deposition in beagle dogs. *Journal of Periodontal Research*, 45, 658-663.
299. King, G.N. and Hughes, F.J. (2001). Bone morphogenetic protein-2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing. *Journal of Clinical Periodontology*, 28, 465-475.
300. Blumenthal, N.M., Koh-Kunst, G., Alves, M.E., Miranda, D., Sorensen, R.G., Wozney, J.M. and Wikesjo, U.M. (2002). Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon. *Journal of Periodontology*, 73, 1494-1506.
301. King, G.N., King, N. and Hughes, F.J. (1998). The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *Journal of Periodontology*, 69, 561-570.
302. Ripamonti, U., Herbst, N.N. and Ramoshebi, L.N. (2005). Bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal tissue engineering: experimental studies in the non-human primate *Papio ursinus*. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16, 357-368.
303. Reynolds, M.A., Kao, R.T., Camargo, P.M., Caton, J.G., Clem, D.S., Fiorellini, J.P., Geisinger, M.L., Mills, M.P., Nares, S. and Nevins, M.L. (2015). Periodontal regeneration - intrabony defects: a consensus report from the AAP regeneration workshop. *Journal of Periodontology*, 86, S105-107.
304. Pietruska, M., Pietruski, J., Nagy, K., Brex, M., Arweiler, N.B. and Sculean, A. (2012). Four-year results following treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix derivative alone or combined with a biphasic calcium phosphate. *Clinical Oral Investigations*, 16, 1191-1197.

305. Chen, F., Wu, Z., Wang, Q., Wu, H., Zhang, Y., Nie, X. and Jin, Y. (2005). Preparation and biological characteristics of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded dextran-co-gelatin hydrogel microspheres, in vitro and in vivo studies. *Pharmacology*, 75, 133-144.
306. Fiorellini, J.P., Howell, T.H., Cochran, D., Malmquist, J., Lilly, L.C., Spagnoli, D., Toljanic, J., Jones, A. and Nevins, M. (2005). Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *Journal of Periodontology*, 76, 605-613.
307. Cha, J.K., Lee, J.S., Kim, M.S., Choi, S.H., Cho, K.S. and Jung, U.W. (2014). Sinus augmentation using BMP-2 in a bovine hydroxyapatite/collagen carrier in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 86-93.
308. Saito, E., Suarez-Gonzalez, D., Murphy, W.L. and Hollister, S.J. (2015). Biomineral Coating Increases Bone Formation by Ex Vivo BMP-7 Gene Therapy in Rapid Prototyped Poly(l-lactic acid) (PLLA) and Poly(epsilon-caprolactone) (PCL) Porous Scaffolds. *Advances Healthcare Materials*, 4, 621-632.
309. Talwar, R., Di Silvio, L., Hughes, F.J. and King, G.N. (2001). Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *Journal of Clinical Periodontology*, 28, 340-347.
310. Wikesjo, U.M., Lim, W.H., Thomson, R.C., Cook, A.D., Wozney, J.M. and Hardwick, W.R. (2003). Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioabsorbable space-providing macroporous membrane with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Journal of Periodontology*, 74, 635-647.
311. Wikesjo, U.M., Qahash, M., Thomson, R.C., Cook, A.D., Rohrer, M.D., Wozney, J.M. and Hardwick, W.R. (2004). rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 15, 194-204.
312. Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M.L., Schenk, R.K. and Lynch, S.E. (2003). Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *Journal of Periodontology*, 74, 1282-1292.
313. Bizenjima, T., Seshima, F., Ishizuka, Y., Takeuchi, T., Kinumatsu, T. and Saito, A. (2015). Fibroblast growth factor-2 promotes healing of surgically created periodontal defects in rats with early, streptozotocin-induced diabetes via increasing cell proliferation and regulating angiogenesis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42, 62-71.
314. Ishii, Y., Fujita, T., Okubo, N., Ota, M., Yamada, S. and Saito, A. (2013). Effect of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in combination with beta tricalcium phosphate on root coverage in dog. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71, 325-332.
315. Jansen, R.G., van Kuppevelt, T.H., Daamen, W.F., Kuijpers-Jagtman, A.M. and Von den Hoff, J.W. (2009). FGF-2-loaded collagen scaffolds attract cells and blood vessels in rat oral mucosa. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 38, 630-638.

316. Takayama, S., Murakami, S., Shimabukuro, Y., Kitamura, M. and Okada, H. (2001). Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *Journal of Dental Research*, 80, 2075-2079.
317. Windisch, P., Stavropoulos, A., Molnar, B., Szendroi-Kiss, D., Szilagy, E., Rosta, P., Horvath, A., Capsius, B., Wikesjo, U.M. and Sculean, A. (2012). A phase IIa randomized controlled pilot study evaluating the safety and clinical outcomes following the use of rhGDF-5/beta-TCP in regenerative periodontal therapy. *Clinical Oral Investigations*, 16, 1181-1189.
318. Stavropoulos, A., Windisch, P., Gera, I., Capsius, B., Sculean, A. and Wikesjo, U.M. (2011). A phase IIa randomized controlled clinical and histological pilot study evaluating rhGDF-5/beta-TCP for periodontal regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 1044-1054.
319. Kwon, D.H., Bennett, W., Herberg, S., Bastone, P., Pippig, S., Rodriguez, N.A., Susin, C. and Wikesjo, U.M. (2010). Evaluation of an injectable rhGDF-5/PLGA construct for minimally invasive periodontal regenerative procedures: a histological study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 37, 390-397.
320. Yamano, S., Haku, K., Yamanaka, T., Dai, J., Takayama, T., Shohara, R., Tachi, K., Ishioka, M., Hanatani, S., Karunakaran, S. (2014). The effect of a bioactive collagen membrane releasing PDGF or GDF-5 on bone regeneration. *Biomaterials*, 35, 2446-2453.
321. Yukna, R., Salinas, T.J. and Carr, R.F. (2002). Periodontal regeneration following use of ABM/P-1 5: a case report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 22, 146-155.
322. Park, C.H., Rios, H.F., Jin, Q., Bland, M.E., Flanagan, C.L., Hollister, S.J. and Giannobile, W.V. (2010). Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces. *Biomaterials*, 31, 5945-5952.
323. Clark, R.A.F. and Singer, A.J. (2000). CHAPTER 61 - *Wound Repair: Basic Biology To Tissue Engineering*. In *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*, R.P.L.L. Vacanti, ed. (San Diego: Academic Press), 857-878.
324. Orr, A.W., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., Deckmyn, H. and Schwartz, M.A. (2006). Matrix-specific Suppression of Integrin Activation in Shear Stress Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 4686-4697.
325. Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
326. Yang, X. and Wang, H. (2010). Electrospun Functional Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. In *Tissue Engineering*, D. Eberli, ed. (Croatia: INTECH).
327. de Fogerolles, A.R., Sprague, A.G., Nickerson-Nutter, C.L., Chi-Rosso, G., Rennert, P.D., Gardner, H., Gotwals, P.J., Lobb, R.R. and Kotliansky, V.E. (2000).

- Regulation of inflammation by collagen-binding integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ in models of hypersensitivity and arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 721-729.
328. Behring, J., Junker, R., Walboomers, X.F., Chessnut, B. and Jansen, J.A. (2008). Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*, 96, 1-11.
329. Mochizuki, M., Hirano, M., Kanmuri, Y., Kudo, K. and Tokiwa, Y. (1995). Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effects of draw ratio on enzymatic degradation. *Journal of Applied Polymer Science*, 55, 289-296.
330. Heydarkhan-Hagvall, S., Schenke-Layland, K., Dhanasopon, A.P., Rofail, F., Smith, H., Wu, B.M., Shemin, R., Beygui, R.E. and MacLellan, W.R. (2008). Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 2907-2914.
331. Matsunaga, T., Yanagiguchi, K., Yamada, S., Ohara, N., Ikeda, T. and Hayashi, Y. (2006). Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76A, 711-720.
332. Kilpadi, K.L., Chang, P.L. and Bellis, S.L. (2001). Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57, 258-267.
333. Pepla, E., Besharat, L.K., Palaia, G., Tenore, G. and Migliau, G. (2014). Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Annali di Stomatologia*, 5, 108-114.
334. Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ghaemi, N. and Shabani, I. (2010). Nanohydroxyapatite-coated electrospun poly(l-lactide) nanofibers enhance osteogenic differentiation of stem cells and induce ectopic bone formation. *Biomacromolecules*, 11, 3118-3125.
335. Ling, L.E., Feng, L., Liu, H.C., Wang, D.S., Shi, Z.P., Wang, J.C., Luo, W. and Lv, Y. (2015). The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 103, 1732-1745.
336. Cowan, C.M., Aghaloo, T., Chou, Y.-F., Walder, B., Zhang, X., Soo, C., Ting, K. and Wu, B. (2007). MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Engineering*, 13, 501-512.
337. Nakamura, Y., Tensho, K., Nakaya, H., Nawata, M., Okabe, T. and Wakitani, S. (2005). Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice. *Bone*, 36, 399-407.
338. Hakki, S.S., Bozkurt, B., Hakki, E.E., Kayis, S.A., Turac, G., Yilmaz, I. and Karaoz, E. (2014). Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic

- differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102, 119-130.
339. Sicchieri, L.G., Crippa, G.E., de Oliveira, P.T., Beloti, M.M. and Rosa, A.L. (2012). Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6, 155-162.
 340. Murphy, C.M., O'Brien, F.J., Little, D.G. and Schindeler, A. (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European Cell Materials*, 26, 120-132.
 341. Benatti, B.B., Silverio, K.G., Casati, M.Z., Sallum, E.A. and Nociti, F.H., Jr. (2007). Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 103, 1-6.
 342. Reignier, J. and Huneault, M.A. (2006). Preparation of interconnected poly(ϵ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching. *Polymer*, 47, 4703-4717.
 343. Chuenjitkuntaworn, B., Inrung, W., Damrongsri, D., Mekaapiruk, K., Supaphol, P. and Pavasant, P. (2010). Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94A, 241-251.
 344. Thadavirul, N., Pavasant, P. and Supaphol, P. (2014). Development of polycaprolactone porous scaffolds by combining solvent casting, particulate leaching, and polymer leaching techniques for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102, 3379-3392.
 345. St-Pierre, J.-P., Gauthier, M., Lefebvre, L.-P. and Tabrizian, M. (2005). Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds. *Biomaterials*, 26, 7319-7328.
 346. Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E. and Nuber, G. (1995). A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*, 36, 837-842.
 347. Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G. (1998). Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 19, 1405-1412.
 348. Brandt, J., Henning, S., Michler, G., Hein, W., Bernstein, A. and Schulz, M. (2010). Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 283-294.
 349. Königsberger, E. and Königsberger, L. (2006). *Biomineralization : medical aspects of solubility*, (Chichester, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley).

350. Shapira, A., Kim, D.H. and Dvir, T. (2014). Advanced micro- and nanofabrication technologies for tissue engineering. *Biofabrication*, 6, 020301.
351. Ribeiro, N., Sousa, S.R., van Blitterswijk, C.A., Moroni, L. and Monteiro, F.J. (2014). A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. *Biofabrication*, 6, 035015.
352. Prabhakaran, M.P., Venugopal, J. and Ramakrishna, S. (2009). Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5, 2884-2893.
353. Chae, T., Yang, H., Leung, V., Ko, F. and Troczynski, T. (2013). Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24, 1885-1894.
354. Chen, J.P. and Chang, Y.S. (2011). Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 86, 169-175.
355. Inanc, B., Arslan, Y.E., Seker, S., Elcin, A.E. and Elcin, Y.M. (2009). Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 90, 186-195.
356. Shang, S., Yang, F., Cheng, X., Walboomers, X.F. and Jansen, J.A. (2010). The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells. *European Cell Materialia*, 19, 180-192.
357. Dey, S. and Pal, S. (2009). Evaluation of Collagen-hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering. In 13th International Conference on Biomedical Engineering, Volume 23, C. Lim J.H. Goh, eds. (Springer Berlin Heidelberg), 1267-1270.
358. Evers, H., Birngruber, C.G., Ramsthaler, F., Muller, U., Bruck, S. and Verhoff, M.A. (2011). [Differentiation of epithelial cell types by cell diameter]. *Archiv für Kriminologie*, 228, 11-19.
359. Jung, M.R., Shim, I.K., Chung, H.J., Lee, H.R., Park, Y.J., Lee, M.C., Yang, Y.I., Do, S.H. and Lee, S.J. (2012). Local BMP-7 release from a PLGA scaffolding-matrix for the repair of osteochondral defects in rabbits. *Journal of Controlled Release*, 162, 485-491.
360. Jo, J.Y., Jeong, S.I., Shin, Y.M., Kang, S.S., Kim, S.E., Jeong, C.M. and Huh, J.B. (2015). Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.
361. Moreau, M.F., Gallois, Y., Baslé, M.-F. and Chappard, D. (2000). Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 21, 369-376.

362. Zhang, Y., Cheng, X., Wang, J., Wang, Y., Shi, B., Huang, C., Yang, X. and Liu, T. (2006). Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor- β 1 DNA for periodontal tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344, 362-369.
363. Seda Tigli, R., Karakeçili, A. and Gumusderelioglu, M. (2007). In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674.
364. Bertl, K., An, N., Bruckmann, C., Dard, M., Andrukhov, O., Matejka, M. and Rausch-Fan, X. (2009). Effects of enamel matrix derivative on proliferation/viability, migration, and expression of angiogenic factor and adhesion molecules in endothelial cells in vitro. *Journal of Periodontology*, 80, 1622-1630.
365. Gümüşderelioglu, M., Karakeçili, A. and Demirtaş, T.T. (2011). Osteogenic activities of MC3T3-E1 cells on heparin-immobilized poly(caprolactone) membranes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26, 257-269.
366. Tolga Demirtas, T., Karakeçili, A.G. and Gumusderelioglu, M. (2008). Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 729-735.
367. Webster, T.J., Siegel, R.W. and Bizios, R. (1999). Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 20, 1221-1227.
368. Wei, K. and Kim, I.-S. (2013). Fabrication of Nanofibrous Scaffolds by Electrospinning.
369. Zhu, L., Ye, X., Tang, G., Zhao, N., Gong, Y., Zhao, Y., Zhao, J. and Zhang, X. (2007). Biomimetic coating of compound titania and hydroxyapatite on titanium. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 83, 1165-1175.
370. Akkouch, A., Zhang, Z. and Rouabhia, M. (2014). Engineering bone tissue using human dental pulp stem cells and an osteogenic collagen-hydroxyapatite-poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. *Journal of Biomaterials Applications*, 28, 922-936.
371. Phipps, M.C., Clem, W.C., Grunda, J.M., Clines, G.A. and Bellis, S.L. (2012). Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration. *Biomaterials*, 33, 524-534.
372. Phipps, M.C., Xu, Y. and Bellis, S.L. (2012). Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PLoS One*, 7, e40831.
373. Beck, G.R., Sullivan, E.C., Moran, E. and Zerler, B. (1998). Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in

- differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 68, 269-280.
374. Tansel, H. (2006). Çene yüz bölgesi ameliyatları ile serum alkalın fosfataz arasındaki ilişkinin klinik olarak araştırılması, Doktora Tezi. (Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
375. Yazid, M.D., Ariffin, S.H., Senafi, S., Razak, M.A. and Wahab, R.M. (2010). Determination of the differentiation capacities of murines' primary mononucleated cells and MC3T3-E1 cells. *Cancer Cell International*, 10, 42.
376. Beck, G.R., Jr., Sullivan, E.C., Moran, E. and Zerler, B. (1998). Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 68, 269-280.
377. Shirai, K., Ishisaki, A., Kaku, T., Tamura, M. and Furuichi, Y. (2009). Multipotency of clonal cells derived from swine periodontal ligament and differential regulation by fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein. *Journal of Periodontal Research*, 44, 238-247.
378. Saito, Y., Yoshizawa, T., Takizawa, F., Ikegame, M., Ishibashi, O., Okuda, K., Hara, K., Ishibashi, K., Obinata, M. and Kawashima, H. (2002). A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *Journal of Cell Science*, 115, 4191-4200.
379. Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 658, 43-49.
380. Wang, C.Y., Yang, S.F., Wang, Z., Tan, J.M., Xing, S.M., Chen, D.C., Xu, S.M. and Yuan, W. (2013). PCAF acetylates Runx2 and promotes osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 31, 381-389.
381. Yang, L., Zhang, Y., Dong, R., Peng, L., Liu, X., Wang, Y. and Cheng, X. (2010). Effects of adenoviral-mediated coexpression of bone morphogenetic protein-7 and insulin-like growth factor-1 on human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 45, 532-540.
382. Ho, M.-H., Liao, M.-H., Lin, Y.-L., Lai, C.-H., Lin, P.-I. and Chen, R.-M. (2014). Improving effects of chitosan nanofiber scaffolds on osteoblast proliferation and maturation. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4293-4304.
383. Gu, K., Zhang, L., Jin, T. and Rutherford, R.B. (2004). Identification of Potential Modifiers of Runx2/Cbfa1 Activity in C2C12 Cells in Response to Bone Morphogenetic Protein-7. *Cells Tissues Organs*, 176, 28-40.
384. Grzesik, W.J. and Narayanan, A.S. (2002). Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13, 474-484.

385. Sodek, J., Chen, J., Nagata, T., Kasugai, S., Todescan, R., Li, I.W. and Kim, R.H. (1995). Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 760, 223-241.
386. Giachelli, C.M. and Steitz, S. (2000). Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology*, 19, 615-622.
387. Beck, G.R., Zerler, B. and Moran, E. (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8352-8357.
388. Chen, Y., Huang, Z., Li, X., Li, S., Zhou, Z., Zhang, Y., Feng, Q. and Yu, B. (2012). In Vitro Biocompatibility and Osteoblast Differentiation of an Injectable Chitosan/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffold. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 6.

EKLER

EK-1.İşnlama Sertifikası



TÜRKİYE ATOM ENERJİSİ KURUMU
Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi



TURKISH ATOMIC ENERGY AUTHORITY
Sarayköy Nuclear Research and Training Center

İŞINLAMA SERTİFİKASI
IRRADIATION CERTIFICATE

Tarih (Date) : **26.11.2013**
Sertifika No. (Certificate No.) : **T386-1-13**

Bu sertifika, aşağıdaki ürünün/ürünlerin, ilgili yönetmelik ve standartlara uygun olarak Co-60 gama ışınlarıyla, belirtilen dozda işinlandığını belgelendirir.

This document certifies that the product/products, given below has/have been treated by Co-60 gamma rays with the dose indicated in accordance with the relevant regulations and standards.

| | |
|---|--|
| Firma (Company): SÜHAN GÜRBÜZ | İşnlama tarihi ve işlem numarası (Irradiation date and process number): 20.11.2013 P898 |
| Ürün/Ürünler (Product/Products) : Membran | Ürün miktarı (Amount of product): 1 kutu. |
| Ürün Lot numarası (Product Lot number): | Verilen doz (kGy) (Delivered Dose): En düşük doz (min.) : 26,1 En yüksek doz (max.): 32,1 |

Mühür / Tarih

26.11.2013

Merkez Müdür Yardımcısı
Deputy Director

Ad Soyad İmza
Name / Signature

Dr. Ali TANRIKUT

FRM-08-GIT-02-03 Rev.No/Tarih: 00/-

Saray Mah. Atom cad. No:27 06983 Kazan – Ankara / TÜRKİYE Tel: +90(312) 810 15 00 Fax:+90(312) 815 43 07

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Gürbüz, Sühan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 13/12/1985 Neuilly Sur-Seine/PARİS
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 203 42 45
 Faks : 0 (312) 203 42 45
 e-posta : suhangurbuz@gazi.edu.tr

| Eğitim Derecesi | Okul/Program | Mezuniyet yılı |
|--------------------|---|---------------------------|
| Doktora | İstanbul Üniversitesi-Gazi Üniversitesi /Diş Hekimliği Fakültesi/Periodontoloji Anabilim Dalı | Devam ediyor |
| Lisans | İstanbul Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi | 2004-2009 |
| Lise | Özel Atayurt Fen Lisesi | 2001-2004 |
| Ortaokul | Eskişehir Anadolu Lisesi | 1997-2001 |
| İlkokul | Eskişehir Dumlupınar İlkokulu | 1992-1997 |
| İş Deneyimi, Yıl | Çalıştığı Yer | Görev |
| 2011- Devam ediyor | Gazi Üniversitesi | Araştırma Görevlisi (ÖYP) |
| Yabancı Dili | | |
| İngilizce | | |
| Aldığı Burslar | TÜBİTAK BİDEB 2211 | 2009-2014 |



GAZİ GELECEKTİR..