

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**KALVARİYAL KEMİK DEFEKTLERİNİN
BMP-2 TRANSFEKSİYONU YAPILMIŞ
KEMİK STROMAL HÜCRE VE DOKU
İSKELESİ İLE ONARIMI**

Dr. Altuğhan Cahit VURAL

UZMANLIK TEZİ

**KIRIKKALE
2012**

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**KALVARİYAL KEMİK DEFEKTLERİNİN
BMP-2 TRANSFEKSİYONU YAPILMIŞ
KEMİK STROMAL HÜCRE VE DOKU
İSKELESİ İLE ONARIMI**

Dr. Altuğhan Cahit VURAL

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU**

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

**KIRIKKALE
2012**

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

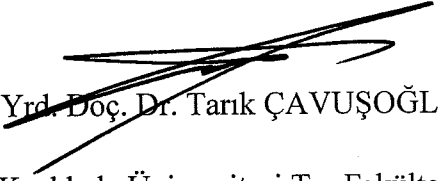
Tez Savunma Tarihi: .././2012


Doç. Dr. İbrahim VARGEL

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

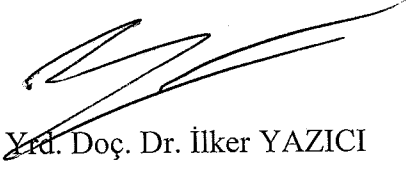
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD. Başkanı

Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD.


Yrd. Doç. Dr. İlker YAZICI

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD Üye

Üye

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimine başladığım ilk gün benim için aslında doğru yerdeyim demek için yetmişti. Gerçek buydu burası doğru yerdi ama zaman içinde sorumluluklarımın da artmasıyla birçok kez umutsuzluğa kapıldım. Plastik cerrahi kuşkusuz ışıltılı bir yoldu ama zaman zaman gerçek resmi görmek imkansızlaşıyordu. Tam olarak ifade etmek gerekirse tökezlemek yiğitliktendi. Benimde her tökezlediğimde elini verip beni ayağa kaldıran, hekimlik onuruna yakışan, etik değerlere bağlı her cümlesinde ekibin bir parçası olduğunuzu son halkaya kadar size hissettiren cerrahi dehasıyla kendime örnek aldığım eğitimimde yetişmemde her anlamda büyük pay sahibi değerli tez danışmanım kıymetli hocam sn Yrd.Doç.Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU'na, plastik cerrahideki geniş vaka portföyü ile Türkiye'nin her yöresinden hastası olup onların hepsine Kırıkkale'de gönülden canla başla hizmet veren, hepimizin takdir ettiği ayrıca tez dönemimde benimle birlikte masanın gerekirse başında gerekirse benim başımda bulunan üstümdeki emeği ve hakkı ödenmez bölüm başkanım değerli hocam Doç.Dr. İbrahim VARGEL' e, ışıltılı fikirlerin sahibi olup onların bilimsel değerlilik kazanmasındaki usta mimar, bana birçok ilk ameliyatımı yaptıran, kendisine dert yanacak kadar anlayışlı ve yakın gördüğüm çok kıymetli hocam Yrd.Doç.Dr. İlker YAZICI' ya, beni bırakıp Kütahya'ya gittiği günden beri perişan olduğum beni kardeşinden ayırmayan abim olan, Op.Dr. Esen İbrahim KARAKAYA' ya çok teşekkür ederim

Akademisyenliğine ve yöneticiliğine hayran olduğum adaleti ile herkesin takdirini almış omurgalı, onurlu, başı dik insan ve en önemlisi Karadenizli hemşehrim, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ' a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Hacettepe Üniversitesindeki kimsesizlik duygumuzu ortadan kaldıran bize odasını açıp her daim mutluluk pompalayan Hacettepe'nin gülümseyen yüzü cana yakın değerli hocam Hacettepe Spor Kulübü başkanı Prof.Dr. Hakan Hamdi Çelik'e, bu tezin bilimsel yaşama kazandırılmasında hasta olduğu günler dahi hasta yatağında bilgisayar başında analizlerini sürdüren bizi yarı yolda bırakmayan öğütleri ile yön verip kargaşayı sonlandıran kıymetli hocam Prof.Dr. Petek KORKUSUZ'a, biyokimyasal analizlerde akademik tecrübesiyle çalışmamıza değer kazandıran

Prof.Dr.Üçler KISA'ya, Doku kültürünü üretilip bizimle birlikte haftasonunda bile gelip çalışmamıza katılan Doç.Dr.Mustafa TÜRK'e, Mikrotomografi analizlerini yaparak çok kıymetli zamanını ayıran ve gerçek bir fedakarlık yapan Yrd.Doç.Dr.Orkun ERSOY'a, Doku laboratuvarında gecesini gündüzüne katan özverili çalışması ile tezin sahibi gibi davrandığını bildiğim değerli akademisyen Dr.Sedat ODABAŞ'a, Gen ekspresyonu çalışmalarının bence yıldızı, emeği ile büyüleyici bir iş çıkaran Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetikten Uzm. Atiye Seda YAR'a teşekkür ederim.

Aynı dert ve tasalarla karşılaşmış birbirimize omuz verdiğimiz, umutsuzluğa kapıldığımız zamanlarda dahi moral aşılayan ve desteği ile tezin son haline kadar beni hiç yalnız bırakmayan Dr.Murat GÜREL'e, nazımın geçtiğini bildiğim nazımı çeken Dr. Sevin FARİZ ve Dr. Osman Ünsal DEMİR'e, çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr.Burak ÇAKMAK'a çok teşekkür ederim.

Çocukları için her şeyi yapan, gerçek mutluluk kaynağının aile olduğunu bana öğreten başını eğmeyen rüzgara sırtını değil yüzünü dönen babam E.Kur.Kd.Alb. Hasan Basri VURAL'a, duasını esirgemeyen kalbi ile her zaman yanımda olduğunu bildiğim her sıkıntıda koşu koşu yardım eden annem Ecz. Fatma Hülya VURAL'a, Yaşadığım sıkıntılarda benimle hop oturup hop kalkan kanımdan canımdan kardeşlerim ekonomist Dr. Neslihan VURAL'a ve Av.Bikem VURAL'a, İstanbuldaki şahaser yapıların mimarı olan kendisi ile gurur duyduğumuz ailemizin büyüklerinden Nihal SEVİN'e ve bana ağabeylik yapan Dr.Erce SEVİN'e tüm katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte yeri geldiğinde oğluma da kızıma da sarılıp yorgun uyuya kalan bir anne, babasız geçen gecelerde iki yavrumun da biricik anneleri şikayet etmeden göğüs geren hayat ışığım, kıymetlim, gözbebeğim eşim Uzm. Dr. Ece VURAL'a, en büyük moral kaynağım kızım Hanzade Beril VURAL'a ve ailemizin yeni üyesi güler yüzlü oğlum Basri Arhan VURAL'a teşekkür ederim.

Dr. Altuğhan Cahit VURAL

Kırkkale 2012

ÖZET

Vural A. C, Kalvarial kemik defektlerinin BMP-2 transfeksiyonu yapılmış kemik stromal hücre ve doku iskelesi ile onarımı, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim dalı Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2012

Kraniyofasiyal defektlerin tedavisi hem hasta hemde plastik cerrah açısından günümüzde önemli sorunlardan birisidir. Kalvaryal hasarlar konjenital olabileceği gibi travma ve neoplazi gibi pek çok edinsel faktörler neticesinde meydana gelebilir. Günümüzde Ototogreft ile kemik defektinin tedavi edilmesi, bu sorunun giderilmesi için altın standart olarak kabul edilir fakat her greftleme yönteminde olduğu gibi otogreft yönteminde de çeşitli komplikasyonlar karşımıza çıkmaktadır. Yara enfeksiyonu, kanama, parestezi, bölgesel doku hasarı, hareket etmede kısıtlılık ve verici kemikte kırık gibi erken komplikasyonlar ve verici kısımda kronik ağrı, hoş görünmeyen yara izi ve parestezi görülebilir. Günümüzde doku kayıplarını onarmada doku mühendisliği çeşitli yapay iskeleler kurarak tedavide yeni stratejilerin gelişmesinde tıbbi yardımcı olmaktadır. Bu projede doku mühendisliğinin temel yaklaşımından yola çıkarak yeni bir metotla, kalvaryal defekt oluşturulmuş hayvan modellerinde, bu defektin sentetik gözenekli doku uyumlu jelatin sponge üzerine kemik stromal hücrelerinin kemik morfojenik proteini olan BMP-2 sentezleyici plasmid ile transfekte edilip genetik olarak modifiye edilerek hazırlanan doku iskelesinin defektin onarımı üzerine olan etkilerini ortaya koymak amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda BMP-2 'nin kemik defektini onarımında yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada amacımız kalvarial kemik defektlerinin BMP-2 transfeksiyonu yapılmış kemik stromal hücre ve doku iskelesi ile onarımının etkilerini ortaya koymaktır. Scaffold ve otogreft gruplarında toplam 13 adet, diğer negatif kontrol, kemik stromal hücre gruplarında toplam 12 adet ve BMP-2 transfekte grubumuzda da toplam 14 adet olmak üzere negatif kontrol grubu dahil toplam beş deney grubu oluşturulmuştur. Tüm deneklerde 6 mm'lik kranial defekt oluşturulduktan sonra gruba spesifik işlem yapıp dördüncü haftada her bir gruptan 3 adet BMP-2 transfekte grubundan 6 adet olmak üzere ve kalan ratların hepsi 16. Haftada sakrifiye edilip gerekli histolojik, biyokimyasal ve radyolojik incelemeye

tabii tutulmuştur. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde BMP-2 transfekte edilen grup otogreft kadar kemikleşme oranı göstermese de diğer gruplar içerisinde en fazla yeni kemik oluşumu bu grupta saptanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre yeni kemikleşme oranı ve ALP değerleri arasında bir korelasyon görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). BMP-2 nin kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu histolojik ve radyolojik olarak gösterilmiştir. Kalvaryal defekt hasarlarında BMP-2 transfekte edilmiş kemik stromal hücre doku iskelesinin etkilerini ayrıntılı olarak ortaya konması için klinik ve deneysel başka çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: BMP-2, kemik stromal hücre, rat kalvaryal defektleri

Destekleyen Kurumlar: Kırıkkale üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Vural AC Reconstruction of rat calvarial critical size defect by transfected BMP-2 bone stromal cells.

Craniofacial bone defects still one of the major problems for plastic surgeons. Calvarial defects can be occurred by congenital, travmatic and neoplastic reasons. The gold standart of bone healing is to put autogrefts surgically by some acceptable complications. Wound management problems, parasthesia, local tissue defects, donor bone fractures are some of the autogreft problems after surgery. Tissue engineering helps us alternative methods of tissue transport carier materials. Physicians got positive feedbacks from tissue transport material studies. Bone morphogenetic protein(BMP-2) delivered on an absorbable collagen sponge has been showed to induce the healing critical size calvarial defects in rats. However bone healing could be stimulated more favourable by transfection tecnology of tissue engineering. This study was designed to evaluate the efficacy of BMP-2/absorbable collagen sponge by transfected bone stromal cells. In our study critical size calvarial defects were made in 39 Winstar Albino Rats. 5 groups were tested: No Scaffold (total 6 rats), Absorbable Collagen Sponge(ACS total 6 rats), Autogreft (total 7 rats), ACS+Bone Stromal Cell (total 6 rats), ACS+BMP-2 Transfected Bone Stromal Cell (total 14 rats). New bone formation was assessed radiographically by micro tomography and mamography and histomorphologically at 4 and 16 weeks. Gen expression analysis was made 7 and 14 days. Histologic and radiologic parameters demonstrated increase bone formation in animals treated with transfected BMP-2 bone stromal cells compared with other groups. Best bone formation is autogreft group. Histologic and radiologic parameters demonstrated increase bone formation in animals treated with transfected BMP-2 bone stromal cells compared with other groups. Transfection procedure is helpful for bone healing via BMP-2 citokine. Further work is needed to optimize treatment of critical size defects by BMP-2 transfected bone stromal cells.

Keywords: BMP-2 transfected bone stromal cells, Rat calvarial defect, BMP-2

Acknowledgement: This work was funded by Kırıkkale University Department of Academic Experimental Studies

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
TEŞEKKÜR.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMALAR	IX
KISALTMALAR	IX
RESİMLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik	4
2.2. Kalvaryal Defekt	6
2.3. Kemik Yapısal Elemanları	7
2.4. Kemiğin Gelişim Süreci	9
2.5. Kemik İyileşmesi.....	11
2.6. Kemik Kayıplarında Kullanılan Greftler.....	13
2.7. Kemik İliği Stroma Kök Hücreleri	17
2.8. Kemik Morfogenetik Proteinler	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Deney Grupları	24
3.2. Kalvaryal Defekt Oluşturulması.....	26
3.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	32
3.4. Örneklerin Alınması	32
3.5. Kemik İliği Kök Hücrelerinin İzolasyonu.....	34
3.6. Transfeksiyon Çalışmaları.....	35
3.7. Gen Ekspresyonu Çalışmaları	35
3.8. Radyolojik Değerlendirme	37
3.9. Histoloji ve Histomorfometri	37

3.10. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	38
3.11. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Makroskopik Bulgular.....	39
4.2. Histopatoloji-Mikrotomografi ve Biyokimyasal Bulgular	39
4.3. Gen Ekspresyon Bulguları.....	47
4.4. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	47
4.5. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması	53
4.6. Real Time PCR Gen İfadelenme Analizi İstatistik Değerleri	58
5. SONUÇ	60
6. TARTIŞMA	62
7. KAYNAKLAR	66

KISALTMALAR

BMP	Kemik morfojenik protein
BMSCs	Kemik iligi stroma kök hücreleri
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DKM	Deminerale kemik matriksi
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
MAPCs	Multipotent yetişkin progenitör hücreler
MKH	Mezenşimal kök hücre
MPCs	Mezodermal progenitör hücreler
MSC	Mezanşimal kök hücreler
PDGF	Platlet derive growth factor
PEI	Polietilenimin
RNA	Ribonükleik asit
TGF- β ,	Transforming Growth factor
TNF	Tümör nekrotizan faktör

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1.	Kraniyal defekt için ameliyat bölgesi.....	26
Resim 3.2.	Kraniyal defekt oluşturmak için İnsizyon	27
Resim 3.3.	Subkutan doku ve periostun flep şeklinde kaldırılması.....	27
Resim 3.4.	Kemik defektinin oluşturulması	28
Resim 3.5.	Kemik defektinin oluşturulması	28
Resim 3.6.	Standart Kalvaryal Defekt	29
Resim 3.7.	Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması	30
Resim 3.8.	Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması	30
Resim 3.9.	Kemik stromal hücre ve BMP-2 plazmid yüklenmiş doku iskelesi	31
Resim 3.10.	Kranial Defektin son hali	31
Resim 3.11.	Scaffoldun hazırlanması	32
Resim 3.12.	Örnek alınma işlemi görüntüsü	33
Resim 3.13.	Örneğin üstten görüntüsü	34
Resim 4.1.	Birinci ay histolojik görüntüler	41
Resim 4.2.	Dördüncü ay histolojik görüntüler	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Plazmid Klonlama Basamakları.....	36
Şekil 4.1.	1. ay ve 4. ay İstatistiksel veriler	44
Şekil 4.2.	Mikrotomografik kemik hacmi ve kan alkalen fosfataz değerleri.....	46
Şekil 4.3.	ACTB geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.	48
Şekil 4.4.	Runx2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	49
Şekil 4.5.	ALP geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	50
Şekil 4.6.	Colla1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	51
Şekil 4.7.	OC geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	52
Şekil 4.8.	Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki Runx2 geninin mRNA düzeyindeki değişiklik	53
Şekil 4.9.	Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki ALP geninin mRNA düzeyindeki değişiklik	54
Şekil 4.10.	Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki Colla1 geninin mRNA düzeyindeki değişiklik	55
Şekil 4.11.	Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki OC geninin mRNA düzeyindeki değişiklik	56

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. İnsan Kemik Morfogenetik Proteinleri ve Temel Fizyolojik Özellikleri.....	20
Tablo 4.1. Rat kemik dokusunda 7. ve 14. günlerdeki kontrol ile otogreft grubu arasındaki Runx2, ALP, Col1a1 ve OC gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi.....	58
Tablo 4.2. Rat kemik dokusunda 7. ve 14. günlerdeki kontrol ile kemik stromal hücre grubu arasındaki Runx2, ALP, Col1a1 ve OC gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi.....	58
Tablo 4.3. Rat kemik dokusunda 7. ve 14. günlerdeki kontrol ile transfekte BMP-2 grubu arasındaki Runx2, ALP, Col1a1 ve OC gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi.....	59

1. GİRİŞ

Kraniyofasiyal bölgedeki defektlerin tedavisi hem hasta hem de plastik cerrah açısından günümüzde önemli sorunlardan birisidir. Kraniyofasiyal bölgede yer alan kemiklerin pek çoğu membranöz kemik grubundadır [1, 2]. Özellikle çocuk yaş grubunda, split edilerek greft alınma güçlüğünden dolayı membranöz kemik kaynaklı otogreft kullanma şansı oldukça azalmaktadır [3-5]. Membranöz kemik grefti ile rekonstrüksiyonlarda özellikle allogreftlerde “greft rezorpsiyonu”na sık rastlanmakta ve bu nedenle çoğu zaman uygulanan greftin kaderi tahmin edilememektedir. Membranöz kemik kaynaklı otogreftlerin sınırlı olması ve buna bağlı yeterli kemiğin her zaman bulunamaması, donör alan morbiditesi yaratması, alınma güçlüğü gibi nedenler başka materyallerin kullanımını gündeme getirmiştir [3, 5]. Kullanılan allogreftlerle hastalık taşınması ve greftin alıcı ile uyum güçlüğü olması gibi sorunlar teknolojik gelişmelere paralel olarak giderek azalmaktadır. Ancak allogreftlerin mevcut kemik çatı ile bütünlük göstermeyip çevresinde fibröz doku oluşturarak sekestre olmaları veya tamamen rezorpsiyona uğramaları klinikte sık görülmektedir. Henüz tam anlamıyla kemiğe spesifik doku uyumlu ideal doku iskeleleri, allogreftler mevcut değildir.

Kalvarya canlılarda vücudun önemli bir parçasını teşkil etmektedir [2]. Çok çeşitli ve genellikle çift ve simetrik olan kemiklerden oluşur [2, 6]. Kalvarya kemiklerinin çok farklı özellikler taşıdığı bilinmektedir [1]. Kalvaryal kemik biyolojisi zayıf bir kanlanma ve az miktarda olan kemik iliğiyle doğrudan ilişkilidir [7]. Bu kemiklerin kanlanması da özel bir yapı gösterir [2]. Kalvarium kemikleri membranözdür ve epifiz alanları yoktur [8]. Kranium 3-4 yaşlarında gelişmenin %80'ine erişir, 7-8 yaşlarında %100 olur. Daha sonraki yıllarda sadece kalınlığında artış meydana gelir [2]. Bu yüzden kraniyofasiyal defektlerin tedavisi hem hasta hem de plastik cerrah açısından günümüzde önemli sorunlardan birisidir.

Kalvaryal kayıplar konjenital olabileceği gibi travma ve tümör gibi pek çok edinsel faktörler neticesinde meydana gelebilir. Günümüzde her ne kadar kranial defektlerin onarılması için belirli prensipler ortaya konmuşsa da, kullanılacak

materyal ve teknik konusunda, henüz belirli bir protokol sağlanamamıştır [9-11]. Günümüzde otogreft ile kemik defektinin tedavi edilmesi, bu sorunun giderilmesi için altın standart olarak kabul edilir, fakat her greftleme yönteminde olduğu gibi otogreft yönteminde de çeşitli komplikasyonlar karşımıza çıkmaktadır. Yara enfeksiyonu, kanama, parestezi, bölgesel doku hasarı, hareket etmede kısıtlılık ve verici kemikte kırık gibi erken komplikasyonların yanında verici kısımda kronik ağrı, hoş görünmeyen yara izi ve parestezi de görülebilir [2, 12]. Bu yüzden son yıllarda doku mühendisliği teknikleri ile insan vücuduna biyolojik olarak uyumlu, çeşitli yapay iskelelerin geliştirilmesi ile otojen greftlerin yerine bu materyaller yardımı ile kemik kayıplarının canlının kendisi tarafından onarımı gibi tedavide yeni stratejilerin gelişmesi gündeme gelmiştir [13, 14].

BMP-2 yaralanan kemik kaynaklı morfogenetik proteindir. Mitojenik ve dönüştürücü bir faktördür. Mezanşimal hücrelerin kırıkta ve kemik hücrelerine farklılaşmasına, ektopik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmektedir [10, 15].

Yapılan çalışmalarda BMP-2 'nin kemik defekti onarımında yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Kalyvaryal defektlerde kemik iyileşmesindeki hızlanmanın tedavi sürecine olumlu katkılarda bulunacağına inanılmaktadır.

Plastik cerrahide kalvaryal defektlerin doku iskeleleri ile onarılması yönünde bir çok ümit veren yeni çalışmalar yapılmaktadır [16, 17]. Kas iskelet sistemine ait dokuların iyileşme potansiyelleri uzun yıllardır araştırılmaktadır. Doğumdan önceki gelişim süreçleri, doğumdan sonraki iskelet tamiri ve yenilenme kapasitesinin hızlandırılması için model olmuştur [2].

Tıp, biyolojik bilimler, malzeme ve mühendislik bilimlerinde yapılan araştırmalardan elde edilen bilgi birikimi, iskelet doku mühendisliği olarak adlandırılan transdisipliner bir yaklaşımın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Doku mühendisliği; temel olarak yapay bazı malzemeler ve hücresel bileşenlerden yararlanarak, hasar görmüş dokunun yerine yenisini koymayı amaçlar [14]. Bu anlamda: yapay ağlar (matriksler), *in vitro* koşullarda elde edilen hücreler ve sistemik veya yerel düzenleyici farmakolojik ajanlar bu alanın asal bileşenleridir.

Doku mühendisliği alanında son yıllarda yapılan çalışmalarda, kök hücreler ve kemik iliği stroma hücreleri önem kazanmıştır [14]. Yüksek oğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip bu hücreler, embriyonik kök hücreler ya da erişkinden elde edilmiş kök hücreler olabilir. Embriyonik kök hücreler, blastositin i hücre kitlesinden elde edilir. Bugüne kadar farelerde, primatlarda ve insanlarda başarıyla elde edilmişlerdir. Embriyonik kök hücreler, çok yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu hücrelerin kardiyomiyositlere, hematopoetik hücrelere, endotel hücrelerine, nöronlara, kondrositlere, adipositlere ve osteoblastlara farklılaşmalarının sağlandığı bildirilmiştir[14]

Bu projede doku mühendisliğinin temel yaklaşımından yola çıkarak kritik boyutta, kalvaryal kemik defekti oluşturulmuş hayvan modelleri kullanılmıştır. Bu defekt sentetik, gözenekli, doku uyumlu, jelatin sponge üzerine kemik morfojenik proteini olan BMP-2 sentezleyici plazmid ile transfekte edilmiş kemik stromal hücreleri genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin kemik defekti onarımı üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

Kemik, skar dokusu gelişmeden doku rejenerasyonunun olması bakımından, benzersiz dinamik bir mekanizmadır. Kemik, değişen fonksiyonel ihtiyaçlara ve mekanik streslere adapte olup yapısını değiştirebilen bir dokudur. Kemik dokusu değişen vasküler, endokrin ve beslenme düzeylerine adapte olabilmektedir. Kemik dokusunun bir özelliği de en sık transplante edilen doku olmasıdır. Kemik iyileşmesinin fizyolojisini bilmek cerraha uygulayacağı cerrahi tekniği seçmede, donör sahanın tercihinde, uygulanacak kemiğin hacminin belirlenmesinde ve kalıcı güvenilir sonucu almada yardımcı olacaktır.

Kemik, embriyolojik olarak mezenşimal hücrelerden gelişmektedir. Gelişme esnasında encondral ya da membranöz kemikleşme yolu ile farklılaşan bir dokudur. Kalsiyum deposu olarak görev yapan kemikler kaslar ile beraber iskelet sistemini oluşturup hareketi sağlar, vücudu destekler, hayati bazı organları çevreleyip korumanın yanı sıra içerdiği kemik iliği sayesinde kan hücrelerinin yapımında da görev almaktadır. Kemik; bir çatı içerisinde bütünleşmiş birçok hücreden oluşan, metabolik ve biyolojik yönden dinamik bir dokudur. Bu özelliği dikkate alındığında, büyüme ve iyileşmesi çok sayıda biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik olayın zincirleme reaksiyonu gibi düşünülebilir [18, 19].

Kemik dokusu periosteum ve endosteum adı verilen iki adet tabaka ile çevrilidir. Periosteum, eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreleyen, kaba, vasküler bir bağ doku tabakasıdır. Periosteumun kemiğe destek sağlamada, beslenmesinde, gelişiminde ve tamir olaylarında önemli rolleri vardır. Yapısında temel olarak kollajen ve elastik lifler bulunur. “Sharpey lifleri” adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe bağlanmaktadır. Perikondrium bol damar içeren, iki tabakalı bir zardır. Kalın dış tabaka “fibröz tabaka” olarak da adlandırılır ve düzensiz, yoğun konnektif dokudan oluşur. Daha ince ve zayıf iç tabaka ise “osteojenik tabaka” olarak bilinir ve gevşek bağ dokusunda olup, hücreden zengindir. Tabakaların her birinin ayrı fonksiyonları vardır. Dış kat metabolizmada rol oynayan damarları ve

lenfatikleri içerir. İç tabakanın hücreleri ise kemik hasarında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik oluşumunu sağlar. Kemik onarımına katılan bu hücreler normal koşullarda aktif değildir. İnce bir retiküler bağ dokusu olan endosteum tabakası, kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreler. Endosteum periosteuma nazaran daha incedir ve tek tabaka osteojenik hücre içerir. Bu tabakanın kemik doku yanında, hematopoetik hücreleri yapabilme özelliği de vardır [18, 19].

Kemik dokusu yapım, yıkım ve onarımda görevli birçok hücre tipinden oluşmaktadır [20].

Kemik organik matriksin yapımından sorumlu olan hücreler osteoblastlardır. Bu hücreler, kübik ya da alçak prizmatik hücrelerden yapılmıştır. Osteoblastlar, matür, metabolik yönden aktiftir. İri nükleusları olup sitoplazmaları koyu bazofilik boyanır. Osteoblast hücreleri çeşitli proteinler salgılamaktadır. Bunlar arasında tip I kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegerin sayılabilir. Bunların yanında kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, BMP (bone morphogenic protein), TGF- β , IGF-I, IGF-II, IL-1, PDGF gibi sinyal proteinlerini salgılar. Kemik yapım aktivitesi sonlanmaya başladığında, osteoblastların bir kısmı oluşturdukları matriks içinde hapsolarak osteositlere dönüşürken, diğer kısmı periost ve endosteal örtücü yüzey hücrelerine dönüşürler [21-23].

Osteoklastlar hormonal ve hücrel mekanizmaların kontrolünde, kemik rezorpsiyonu yapan hücrelerdir. İçerdikleri kollajenaz ile diğer proteolitik enzimleri salgılayarak, kemiğin inorganik ve organik matriksi ile kalsifiye kartilajı çözmektedirler. Bu süreç sonunda "Howship Lakünaları" olarak adlandırılan kemik yüzeyi erozif alanları oluşur. Osteoklastlar, kemik iliğinde yer alan granülositik makrofaj öncülerinden köken alan monositlerin füzyonuyla oluşur. İnterlökin-1, -3, -6 ve -11, TNF- α ve TGF- α 'nın osteoklast oluşumunu etkileyen faktörler olduğu düşünülmektedir. Osteoklastlar, parathormon, kalsitonin ve osteoblast stimule edici faktör gibi çeşitli hormonlara duyarlıdır. Örneğin paratiroid hormonu hücrede RNA sentezini arttırmada etkili olurken, kalsitonun hormonu bunun tersi etki yapmaktadır. Kemik yıkımı, kemiğin şekillenmesinde önemli rol oynar. Bu olay osteoklast ve osteoblastların uyumlu çalışması neticesinde gerçekleşmektedir [20].

Osteositler kemik matriks içerisinde lakün olarak adlandırılan küçük boşluklarda yerleşmiş olgun osteoblastlardır. Her bir osteositten çıkan sitoplazmik uzantılar diğer osteositlere uzanarak bir ağ oluştururlar. Lakünlerde bulunan kanaliküller yardımıyla da kan damarlarına ve diğer lakünlere bağlanırlar. Lokal çevre faktörlerinden etkilenirler ve kemiğe etki eden kuvvetler karşısında siklik adenosin monofosfat (cAMP), osteokalsin ve IGF salgırlar. Bu faktörlerin salgılanmasını takiben, öncül osteoblastların sayısı artarak kemikte remodeling ve kemik apozisyonu görülür. Ayrıca osteositler ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde de önemli rol alırlar [20].

Osteoprogenitör hücreler mitozla çoğalabilen, mezenşimden kaynaklanan, kemik yapıcı öncü hücreler olup, osteoblastlara veya düşük oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücelere farklılaşabilirler. Kemik büyümesinde ve kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünüp, osteoblast hücelerine dönüşürler. Genellikle soluk boyanan nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı hücelere olup, periostun derin tabakasında, Havers kanallarında ve endosteumda bulunurlar [20].

2.2. Kalvaryal Defekt

Kalvaryum; frontal, parietal kemiklerin tümünün, oksipital ve temporal kemiğin küçük bir kesiminin oluşturduğu, beyin dokusunu çevreleyen yapıdır. İç ve dış tabula olmak üzere iki kortikal tabaka ve bunların arasında yer alan kemik iliği (diploe) aralığından oluşur [2, 6, 12].

Kalvaryal defektler çeşitli anomaliler ile beraber doğumsal olabileceği gibi, travma ve tümör gibi bir çok sebeple hayatın ilerlemiş yıllarında da karşımıza çıkabilir. Kalvarium kemikleri membranözdür ve epifiz alanları yoktur [2, 12]. Bu durum kemik iyileşmesi için iyi bir özelliktir. Kranium 3-4 yaşlarında gelişmenin %80'ine erişir, 7-8 yaşlarında %100 olur [6]. Daha sonraki yıllarda sadece kalınlığında artış meydana gelir. Bu yüzden kraniyofasiyal defektlerin tedavisi hem hasta hem de plastik cerrah açısından günümüzde önemli sorunlardan birisidir. İskelet sisteminin diğer kemiklerinde olduğu gibi kalvaryal kemiklerde de sürekli bir döngü süreci yaşanmaktadır [2]. Kalvaryal defektlerin onarımının daha iyi anlaşılması için kemik yapının özellikleri ve iyileşmesine değinmek gerekir.

2.3. Kemik Yapısal Elemanları

Kemik morfolojik olarak nonlameller, kortikal ve kansellöz kemik olarak üçe ayrılır.

Nonlameller kemik embriyonik dönemde, kırık iyileşmesinde, hiperparatiroidizm ve Paget hastalığı gibi patolojik süreçlerde vardır. Gelişigüzel dizili kollajen lifler ve osteoblastlar ile dōşeli düzensiz vasküler boşluklardan oluşur. Daha sonra yeniden yapılanma ile kortikal veya kansellöz kemiğe dönüşür.

Kortikal kemik, kompakt veya lameller kemik olarak da adlandırılır. Nonlameller kemikten yeniden yapılanma sonucu oluşur. Yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarını, uzun kemiklerin dış yüzünü oluşturur. Kortikal kemiğin ana yapısı “Havers sistemi” olarak da adlandırılan osteondur. Osteon uzunlamasına dizili vasküler kanalları (Havers kanalları) saran silindirik şekilli vasküler kemikten oluşur. Horizontal dizilimli kanallar (Volkman kanalları) komşu osteonları birleştirir [24]. Volkman kanalları sayesinde, Havers kanalları kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı dizilimine bağlıdır [20].

Kansellöz kemik (trabeküler kemik) kortikal kemik yüzleri arasında, balpeteği görünümlü, boşluklarında hematopoetik elemanlar içeren, 1 mm kalınlığında trabeküllerden oluşur. Kortikal kemiğe göre daha gevşek yapıda olmasına rağmen, özellikle femur başında ve vertebralarda trabeküllerin kortekse dik yerleşimli dizilimi sayesinde dış yüklenmeye yapısal karşı koyma gücü oluşur. Kansellöz kemik iç endostal yüzeyde sürekli yeniden yapılanma oluşturur.

Kemik matriksi; organik ve inorganik elemanlardan oluşur. Kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi ancak dokudaki organik ve inorganik matriks elemanlarının uyumlu birlikteliğine bağlıdır. Kemik ağırlığının yaklaşık %20’si sudur. Hacminin ise çoğunu kollajen oluştururken, kuru kemik ağırlığının %60-70’ini inorganik kalsiyum fosfat, %30-35’ini ise organik fibröz protein ve kollajen oluşturur. Kemik iliğine kıyasla, kemikteki hücre sayısı daha azdır [24].

Kemik organik matriksi osteoid adı verilen, osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış organik yapıdan oluşur. %90'ını tip I kollajen; %10'unu ise nonkollajenöz proteinler (glikoproteinler, proteoglikanlar), peptitler, karbohidratlar ve lipidler meydana getirir. Nonkollajenöz proteinlerin büyüme faktörlerinin salınımında, hücrelerin organik matrikse tutunmalarında ve organik matriksin kalsifikasyonunda görevli oldukları düşünülmektedir. Gelişmiş bir kemik dokuda lifler paralel ve porlar bırakacak şekilde dizilmiş olup, aralarında hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir [20].

Kemik inorganik elemanlarının başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum, sodyum gibi maddeler gelir. Ayrıca vücuttaki kalsiyumun %99'u, fosforun %85'i, magnezyum ve sodyumun %40-60'ı iskelet sistemindedir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, osteoid mineralizasyonu sayesinde, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır [24].

Kemiğin üç temel ögesi olan kollajen, mineraller ve hücreler durağan olmayıp sürekli olarak yenilenirler. Bu yenilenme kemik üzerine etki eden kuvvetlerle bağlantılı olup, basınç altındaki kemikte rezorpsiyon, gerilim kuvvetleri altında ise apozisyon görülür. Ölen hücrelerin yerine yenisi geçerken, kollajen ve mineraller devamlı olarak rezorbe edilip, yeniden oluşturulur [24]. "Remodelling" adı verilen, rezorpsiyon ve depozisyon işlemleri arasındaki denge sayesinde kemiğin şekli ve hacmi neredeyse değişmeden kalır. Rezorpsiyon depozisyon kadar hızlı devam edemediğinde kemiğin kırılabilirliği artar (Paget hastalığı). Yeniden yapılanmadaki (remodelling) dengenin rezorpsiyon lehine bozulmasında ise osteoporoz ortaya çıkar [20].

Kemik metabolizması hormonlar ve lokal faktörlerin kontrolü altındadır. Bunlardan en önemlileri; parathormon, kalsitonin ve vitamin D'dir. Osteoblastlar kalsiyum reseptörleri içeren yegâne kemik hücreleridir. Bu sebeple osteoblastlar paratiroid hormon etkisindedirler. Parathormon kalsiyumun, kemikte kalsiyum içeren boşluklara geçişini artırarak ekstrasellüler kalsiyum seviyesini düzenler. Vitamin D ise intestinal ve renal kalsiyum bağlayıcı proteinleri uyararak aktif kalsiyum transportunu kolaylaştırır. Kalsitonin de plazma kalsiyum seviyesinde akut artışa

cevap olarak tiroid bezinin parafoliküler hücrelerinden salınır ve kalsiyuma bağlı hücrel metabolik aktiviteyi inhibe eder [20, 24].

2.4. Kemiğin Gelişim Süreci

Kemikte gelişim ve büyüme dinamik bir süreç olup embriyonik hayatta başlayıp erişkin çağa kadar devam eder. Organizma yaşlandıkça denge içinde olan kemik yapım ve yıkım süreci yıkım lehine doğru yol alır. İki tür kemikleşme bulunmaktadır Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu, endokondral kemikleşme ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Kemikleşme hangi türde olursa olsun, ilk oluşan kemik dokusu birincil kemik olarak adlandırılan olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu birincil kemik kalıcı olmayıp yerini olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır [24].

Mezenşimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesine intramembranöz kemikleşme olarak adlandırılmaktadır. Organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın processus coronoideus ve simfisis dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Mezenşim hücreleri önce hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklılaşırlar, daha sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. Bu dokuda bol kılcıl damar gözlenir. Bu damarlar osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonlarını taşır. İyonlar, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Oluşan dokuya kemik trabekülleri denir. Trabeküller içinde kalan osteoblastlar aktivitesi azalmış osteositlere dönüşür. Şekillenen trabeküllerin yüzeyine osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar tek sıra halinde dizilirler ve kemik lamelleri yaparlar. Bu olayın ardı ardına tekrarlanması sonucu birincil kemik trabeküllerinin yüzeylerinde ve kenarlarında lamelli ikincil kemik yapısında katmanlar meydana gelir ve trabeküller kalınlaşıp uzarlar. Bu sırada osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden rezorbe ederken, osteoblastlar da bir taraftan yeni kemik lamelleri eklerler. Böylece birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır. Komşu trabeküller birbirleriyle kaynaşarak spongiyoz kemiği şekillendirirler. Bu

kemiklerin iç ve dış yüzlerinde yine intramembranöz yolla bir miktar kompakt kemik eklenir ve kemikleşme sona erer. Trabeküllerin aralarında kalan mezenşim dokusundan da kemik iliği şekillenir [24].

Uzun ve kısa kemiklerde görülen kemikleşme ise enkonral kemikleşme olarak adlandırılır. Kemikleşme hiyalin kıkırdaktan ufak bir modelle başlayıp, kemik dokusu oluşumuyla sonlanır. Modelin diyafiz kıkırdağını örten perikondriyumun iç katında bulunan mezenşim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklıdır. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında silindirik biçimde bir kemik manşet ortaya çıkar. Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerde önce hipertrofiye, ardından diyafizin orta kısmından başlayarak yıkıma uğrar, ölmelerine neden olur [25, 26]. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur (kemik iliği kavitesi). Periosteumdaki osteoklastlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden girerek, osteoprogenitör ve hematopoetik hücreleri taşırlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Diyafizde şekillenen boşluklara kan damarları ile gelen mezenşim hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerine tek sıra dizilerek kemik dokusu yapmaya başlarlar. Böylece ortaları kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan meydana gelen kemik trabekülleri ortaya çıkar. Kemik trabekülleri ile kan damarlarının aralarında kalan boşluklarda kemik iliği şekillenir. Bu arada kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler mitoz ile çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. Böylece modelin boyu da devamlı olarak uzar. Kemik manşet de kalınlaşıp, epifizlere doğru uzanır ve kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dıştan sarar. Kemikleşme merkezinde olduğu gibi önce kıkırdak matriks, ardından da ilk şekillenenlerin devamı halinde kemik trabekülleri oluşur. Enkonral kemikleşme epifizlere yaklaşıncaya, epifizlerin içlerinde ikincil kemikleşme merkezleri belirir. Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece kıkırdak bir disk kalır ki buna epifiz plağı denir. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönüne doğru bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusu yapar, bu kıkırdak da devamlı olarak yerini kemik

dokusuna bırakır. Böylelikle kemikler belli bir yaşa kadar uzamaya devam eder. En sonunda epifiz plakları da kemikleşir ve kemik büyüme sonlanır [24].

2.5. Kemik İyileşmesi

Vücutta meydana gelen yaralanma esnasındaki tamir esasları kemik iyileşmesinde de geçerli olmakla beraber kemik dokusunun en önemli farkı diğer dokularda iyileşme esnasında meydana gelen fibröz skar dokusunun bu alanda oluşmamasıdır [26]. Bu sayede kemik yaralanmasında uygun koşullar altında hasarlı kemik dokusu organizma tarafından tekrar yerine skar dokusu olmaksızın konabilmektedir [25, 27].

Yara iyileşmesindeki genel prensipler ve evreler kemik dokusunun iyileşmesinde de geçerlidir [28]. Genel olarak 3 evrede incelenir: erken inflamatuvar dönem, onarım dönemi, yeniden yapılanma dönemi (remodeling) [25]. Evreleri birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayırmak güçtür ve her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunur [26-28].

İnflamatuvar fazda önce, kırık bölgesinde yaralanan damarlardan kanama, pıhtılaşmayı sağlamak için trombositlerin toplanmasıyla moleküler aracılardan yaralanma bölgesine salınması ve bunun sonucu olarak pıhtılaşma ile kırık uçları arasında, periost altında ve periost yırtılmışsa bunun etrafında hematoma oluşur. Hematom ikincil kırık iyileşmesinde önemli rol oynar [28]. Yarattığı basınçla kırık uçlarını bir arada tutar, ortamındaki trombositler ile diğer hücrelerden salınan büyüme faktörü ve proteinler ile hücre göçünü, periosteal hücre çoğalmasını ve onarım dokusu matriksinin sentezini başlatır. Açık kırıklarda hematoma boşalmasına bağlı kemik iyileşmesinde gecikme gözlenir [27].

Erken dönemde oluşan vazokonstriksiyonu, vazodilatasyon takip eder ve salınan prostoglandinlerin de yardımıyla bölgeye akut yangı hücreleri (nötrofiller, monositler, lenfositler) göç eder. Kırık uçlarında bozulan dolaşıma bağlı, kemik dokuda daha geniş olmak üzere nekroz bölgesi oluşur [26]. Ortama gelen nötrofiller ve makrofajlar hasarlı dokuyu ortadan kaldırırlar. Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Nötrofiller ve makrofajların

yardımı ile fibrin matriks oluşur. Fibrin matriks içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazır [26, 27].

Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7–12 gün sürer. Bu evrede lokal aracılı mekanizmalarla hassaslaşan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya ve düzenlenmeye başlar. Bunlar granülasyon dokusundan, periosteumun osteojenik tabakası ve endosteumdan köken alan pluripotent hücrelerdir. Bu aşamada kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılar söz konusudur [28]. Prostaglandinlerin etkisi ile yeni osteoklast oluşumu ve mevcut osteoklast aktivitesinde artış olurken; fibroblastlar kollajen, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. Fibroblastlar, vasküler oluşuma yardım etmek üzere stromaya yerleşmeye başlar. Vasküler oluşum arttıkça, kollajen matriks belirginleşir. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdiği kollajen kapsamıyla yakın ilişkilidir [28]. Bu esnada osteoid sekresyonu ve takiben mineralizasyon olur. Kırık hattı bölgesi ve çevresinde yumuşak kallus oluşur. İlk 4–6 haftalık süre içinde oluşan bu kallusun harekete karşı direnci düşüktür. Bu nedenle tespitin sağlam olması önemlidir [26]. Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici (nutrisyen) damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Sonuçta kallus ossifiye olur ve kırık yüzleri arasında nonlameller kemik köprüsü oluşturur. Eğer uygun immobilizasyon yapılmazsa kallus ossifikasyonu yeterince oluşamaz, instabil fibröz birleşme gelişebilir. Periosteumun hasar görmesi ya da ortamdaki uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır [28]. Kemik iyileşmesi en uzun faz olan ve yıllarca sürebilen yeniden yapılanma evresi ile sonlanır. Bu fazda kemik orijinal güç, şekil ve yapısını kazanır. Aksiyal yüklenme ile güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümü gerçekleşir. Wolf kanuna göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin egemen olduğu konveks yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin hakim olduğu

konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani, “kırığın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında geri emilim” olur [27, 28].

Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler yerel ve genel faktörler olarak incelenir [26]. Yerel faktörler; yüksek enerjili travma, kırık uçlarının ucuca gelmemesi, yetersiz immobilizasyon ve kanlanma, eşlik eden yumuşak doku yaralanması, enfeksiyon ile kanser gibi yerel patolojiler ve denervasyon olarak sayılabilir. Genel faktörler içinde ise ileri yaş, sigara, sistemik hastalıklar ve enfeksiyonlar, beslenme bozuklukları, hormonal bozukluklar, vitamin eksiklikleri (A, C, D, B6, K), bazı ilaçlar (nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, steroid, sitotoksik ilaçlar) ve radyoterapi sayılabilir [25-28].

2.6. Kemik Kayıplarında Kullanılan Greftler

Organizmada meydana gelen büyük doku kayıplarını onarmak günümüzde halen cerrahinin önemli sorunlarından birini teşkil etmektedir. Travma, konjenital anomali veya rekonstrüksiyon sonrası doku ihtiyacı gibi bir çok nedenden dolayı doku kayıpları meydana gelmekte ve onarımında kemik greftleri veya yerini tutabilecek çeşitli maddeler halen araştırılıp geliştirilmektedir [29, 30]. Kemik dokusu kayıplarının tedavisinde halen en sık kemik greftleri kullanılmaktadır [31].

Kemik grefti olarak otogreftler ve allogreftler kullanılır. Kemik yerine geçebilecek maddeler arasında ise seramikler, demineralize kemik matriksi, BMP (kemik morfojenik protein), otolog kemik iliği, büyüme faktörleri ve kompozit greftler tercih edilebilir [30, 32].

Kemik doku mühendisliğinin temeli, kemiğin istenen anatomik bölgesinde kemik iyileşmesini sağlamaktır. Klinik başarı, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi (integration) ve oluşan kemiğin fonksiyon görmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ile belirlenir [31, 33].

Yeni kemik dokusu ortaya çıkabilmesi için öncelikle kemiği meydana getirebilecek yeterli sayıda "osteojenik progenitor hücreler" ortamda bulunmalıdır. Kullanılan greft materyalleri alıcı kemik yüzeyine tutunma (osteointegrasyon), yeni

kemik oluşumu (osteogenezis), yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilen (osteokondüktif) veya plüripotent hücrelerinin çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyarabilen (osteoindüktif) özelliklerin birine veya birden fazlasına sahiptirler[31]. Bu özelliklerin bazıları sentetik materyallerde ve saflaştırılmış büyüme faktörlerinde de bulunmaktadır. Bu da doku mühendisliğini, mevcut maddelerin kombinasyonları veya yeni materyaller ile kırık iyileşmesi için en uygun ortamın ve greftleme metotlarının geliştirilmesi yoluna itmiştir. Bu sayede greftleme tekniklerinin maliyetinin azaltılması ve tedavide yeniliklerin elde edilmesi amaçlanmaktadır [32-34].

Aynı bireyin bir yerinden başka bir yerine nakledilen grefte otogreft denir. Otolog ya da otojen greft olarak da isimlendirilebilir. Tek yumurta ikizleri arasında yapılan doku transferlerinde, transfer edilen doku ise izogreft olarak adlandırılır. Allogreft ya da allojenik greft aynı türden fakat genetik olarak farklı iki birey arasında yapılan doku transferidir. Xenogreft ise, bir türden farklı bir türe yapılan doku naklidir [33].

Otolog greftler; kansellöz, kortikal, damarlı (vaskülarize) kortikal ve kemik iliği olarak kullanılabilir. Otogreftlerin farklı derecelerde osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri mevcuttur [31].

Otolog kansellöz kemik greftleri halen spinal füzyon, kemik kayıplarının doldurulması ve kırık tedavisinde kemik iyileşmesini sağlayan en etkili greft materyali olarak bilinir [31]. Otojen kansellöz kemik içinde osteojenik kemik ve kemik iliği hücreleri, osteokondüktif kollajen ve mineral matriksi, matriks proteinleri ve osteoindüktif matriks proteinleri nakledilir. Otojen kemik grefti uygulamaları sırasında karşılaşılan problemler nedeniyle alternatif greft materyalleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kemik greftinin yerini tutabilecek ideal ajan; biyo-uyumlu, biyo-çözünür, osteokondüktif, osteoindüktif, yapısal olarak kemiğe benzer, kolay kullanılabilir ve ekonomik olmalıdır [33, 34].

Kortikal kemik greftleri, otojen kansellöz kemik greftlerine göre biyolojik uyum olarak daha az başarılıdır. Kortikal kemiğin porozitesinin az olması nedeniyle damarsal yapıların greftin içine doğru ilerlemesi zor ve yavaştır. Kortikal kemik, trabeküler kemiğe göre daha az sayıda osteoblastik progenitor hücre içerir. Kortikal

kemikteki hücreler, oksijen difüzyonu ve besin aktarımının az olması nedeniyle nakledilmeye daha az dirençlidir [33, 35].

Herhangi bir kemik grefti cerrahi olarak yerleştirildiğinde, kırık kaynamasına benzer sıra ile; kanama, inflamasyon, dokunun revaskülarizasyonu ve greftin lokal doku ile yer değiştirmesi ve yeniden yapılanması (remodelasyonu) aşamalarından geçer. Başarılı bir greft inkorporasyonu; nakledilen dokunun orijinal doku kadar iyi işlev görmesi yani; mekanik bütünlüğünü ve fonksiyonunu greft inkorporasyonu sırasında ve sonrasında koruması anlamına gelir [35].

Kemik iliği tek başına osteojenik greft olarak kullanılabilir. Aspirasyon sonrası elde edilen kemik iliği; sitokinler, diğer kemik iliği kökenli hücreler gibi osteoblastik progenitorler ve hızlı revaskülarize olan emilebilir biyolojik fibrin matriks içerir.

Allogreftler; poroz yapıları içinde progenitor hücrelerin ve endotelial hücrelerin tutunduğu birçok gözenekli alanlar içerirler. Aynı zamanda, osteoklastlar tarafından rezorbe edildiklerinde serbest kalan kemik matriks içinde büyüme faktörleri de içerirler. Allogreft kemikte, osteoindüktif özellik taşıyan az miktarda kemik morfojenik proteini de bulunur. Demineralizasyon, allogreft kemik matriksindeki büyüme faktörlerinin biyo-yararlanımını artırır [33-35].

Demineralize kemik matriksi (DKM), osteokondüktif ve farklı derecelerde osteoindüktif bir materyal olarak kemik kayıplarını ve boşlukları doldurmak için kullanılır. DKM hızlı bir şekilde yeniden damarlanır ve aynı zamanda otolog kemik iliği için iyi bir taşıyıcıdır.

Kemik morfojenik proteinleri, düşük molekül ağırlıklı kollajen olmayan glikoproteinlerdir. Bu protein ailesi çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörü içeren bir grup olan TGF- β (transforme edici büyüme faktörü- β) grubuna dahil olan dimerik moleküllerden oluşmaktadır. BMP adı ile anılan BMP-2'den BMP-8'e kadar yedi üyesi olmasına rağmen osteojenik proteinler, kırık kaynaklı morfojenik proteinler ya da büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi çeşitli isimlerle anılan otuzdan fazla molekül bu aile içinde yer almaktadır ve hepsi birlikte TGF- β grubunun üçte birinden fazlasını oluştururlar. Kemik morfojenik proteinleri, tüm kemik proteinlerinin ağırlık olarak %0,1'ini oluştururlar [33, 34].

DKM, kemik morfojenik proteinlerinin karışımından oluşur ve immünojeniktir. Ancak saf BMP, immünojenik ve türlere özgü değildir. Rekombinant gen teknolojisi ile kemik morfojenik proteinleri ayrı ayrı üretilmiştir. Klinik kullanımda ise BMP karışımları saflaştırılmış kemik ekstraterinden elde edilmektedir. Çalışılmakta olan rekombinant BMP'ler; rh-OP-1(osteojenik protein 1), rh-BMP-2 ve rh-BMP-7'dir.

Kemiğin ekstrasellüler matriksinden elde edilen büyüme faktörlerinin (DKM, BMP) yanında, kan dolaşımında bulunan diğer büyüme faktörleri de kırık iyileşmesinde etkilidir. TGF- β , kemik biyolojisinde en çok çalışılan büyüme faktörüdür. BMP'leri oluşturan molekül ailesinin tümünü kapsar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF), tavşan tibialarında yapılan osteotomilerde kırık ? iyileşmesini uyardığı gösterilmiştir. Otolog büyüme faktörleri, cerrahi sırasında "cell saver" cihazı yardımıyla toplanan kan pıhtısından santrifüj sonucu elde edilirler. Bu madde özellikle TGF- β ve PDGF'den zengindir. Diğer kırık iyileşmesine etkili faktörlerden temel fibroblast büyüme faktörünün de (bFGF) klinikte kullanımı bulunmaktadır [33, 36].

Gen tedavisi ile ex vivo veya in vivo olarak nükleik asit materyallerinin (DNA veya RNA) hücre içine transferi mümkün olmaktadır. Konjenital veya edinsel hastalıkların tedavisinde gen tedavisi arayışları sürmektedir. Gen tedavisinin, ekzojen kaynaklı osteoindüktif kemik morfojenik proteinlerinin bolus olarak enjekte edilmesine göre avantajları bulunmaktadır [37]. Hücre taşıyıcı ile modifiye edilmiş genetik materyalin kullanılması, zamanlama ve konsantrasyon olarak osteokondüktif matrikse göre daha fizyolojiktir. Kemik iyileşmesinde etkili bazı genler, vektörler yardımıyla başarıyla transfer edilmiştir. (TGF- β 1, LMP-1 ve BMP-2) Viggeswarapu ve ark., LIM mineralizasyon protein-1'i adenoviral vektör aracılığıyla transfer etmiştir [38]. Bu gen tedavisi sayesinde sistemik veya lokal kemik yapımı artırılarak kırık iyileşmesini arttırabileceği düşünülmektedir [31, 33, 35, 39].

2.7. Kemik İliği Stromal Kök Hücreleri

Kök hücreler insan vücudunda bulunan, farklı hücrelere dönüşebilen ve her biri yeni özelleştiği hücre fonksiyonlarına sahip başkalaşım geçirmemiş hücrelerdir [21, 40].

Birçok çalışma kemik iliği stroma hücrelerinin “*multipotent yetiskin progenitör hücreler*” (MAPCs), “MSC’ler”, “*kemik iliği stroma kök hücreleri*” (BMSCs) ve “*mezodermal progenitör hücreler*” (MPCs) gibi isimler aldığını, bazen de bu dokular dışında başka bir yol izleyerek bambaşka dokulara dönüşebildiğini göstermektedir [20]. Sanchez-Ramos kemik iliği stroma hücrelerinin nöronlara dönüşebildiğini; Ferrari ve ark. ise iskelet kas dokusunun onarımında görev alabildiğini göstermiştir [41-43].

Birçok doku ve organda bulunan kök hücrelerin hücre biyolojisi günümüzde çok daha iyi anlaşılmaktadır. İn vitro kültür metotlarındaki gelişmeler önceleri imkansız olarak görülen değişik hücre tiplerinin çoğaltılmasını rutin hale getirmiştir [21]. MSC’ler doğum sonrasında kemik iliğinin hematopoetik olmayan stromasında bulunur. Son çalışmalar kemik iliği stroma hücrelerinin osteoblast, kondrosit, adiposit, myoblast, hepatosit, kardiyomyozit ve nöral hücrelere dönüşebildiğini göstermektedir [11]. MSC’ler kemik iliği, periost, trabeküler kemik, adipoz doku, sinovium, iskelet kasları, diş pulpası ve periodonsiyumdan izole edilmiştir. Bu hücreler kemik, yağ, kıkırdak ve kas dokuları gibi konnektif doku hücrelerine dönüşebilmektedir. Kök hücreler ihtiyaç halinde kan-kemik iliği bariyerinden geçerek dolaşıma katılırlar ve ilgili organa giderek tamir olayına katılırlar [40, 43].

Kemik iliği stromal dokusu retiküler hücreler, adipoz hücreleri, osteojenik hücreler, düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve makrofajlar gibi heterojen hücre popülasyonlarından oluşmuştur [21]. Herhangi bir yaralanma durumunda stromal dokuda bulunan kök hücrelerin katılımıyla tamir meydana gelmektedir. Kemik iliği stroması dışında MSC’ler periost, yağ dokusu ve deriden de elde edilebilmektedir. MSC’ler kıkırdak, kemik, kas, tendon, ligament ve yağ dokusuna dönüşebilen multipotent hücrelerdir. MSC’lerin in vivo ve in vitro olarak osteoblastlara dönüşebildiği birçok çalışmada gösterilmiştir [13]. Literatürde MSC’ler içinde nadir de olsa sadece mezodermal değil, aynı zamanda endodermal dokulara dönüşebilen pluripotent hücrelerin de bulunduğu rapor edilmiştir [11]. İzole edilmesinin kolay

oluşu ve geniş başkalaşım potansiyeli ile MSC'ler klinik kullanım açısından diğer kök hücrelere oranla daha avantajlıdır. Yetişkin MSC'lerin çok yönlü potansiyelinin yanında allojenik transfer sonrası immün reaksiyonun çok az olması MSC'yi hücre terapi uygulamalarındaki doku tamir ve rejenerasyonlarında kullanılan ideal hücre tipi olmasını sağlamaktadır. Sistemik hastalıklar ve lokal doku defektlerinin tedavisinde MSC'lerin kullanılabileceği birkaç çalışmada gösterilmiştir [13]. İn vivo olarak çok az sayıda olduğu için MSC'ler in vivo uygulama öncesinde otolog serum desteğinde in vitro olarak çoğaltılması gerekmektedir. Bazı durumlarda kemik iliğindeki MSC'ler kemik ve kırık dokuya dönüşebilmektedir. Kemik dokusunda hem farklılaşmamış hem de farklılaşmış osteoprogenitör hücrelerin bulunduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak kemik kırıldığında kemik iliği açılmakta ve bol miktarda kanama sonucu hematoma oluşmakta, sonuçta iyi bir tamir potansiyeli meydana gelmektedir. İn vivo olarak eklem kırığı yaralanırsa tamir için çok limitli kapasiteye sahiptir. Günümüzde kırıkta kondrosit progenitör hücrelerin bulunup bulunmadığı kesinleşmemiştir [13]. Kırık yaralanmalarında kök hücreler tamir işleminde görev almaktadır, ancak sayıları ve düzenleyici faktörler limitlidir. Bu hücrelerin çevredeki kas, kemik ve diğer kırıksız dokulardan geldiği düşünülmektedir [40, 43].

Kırık iyileşmesi günümüzde bile bir kısmı çözülememiş bir çok karmaşık biyolojik olay sonucu gerçekleşmektedir. Bu olayların içinde kemik indüksiyonu ve kondüksiyonu için hücre içi ile hücre dışı sinyal sistemi de yer almaktadır. Kemik kırığında birinci gün hematoma oluşur, mezenşimal hücreler göç ederler ve kemik iliğindeki MSC'lerde osteojenik farklılaşma başlar. İntramembranöz kemikleşme için preosteoblastlar ve osteoblastların değişim ve başkalaşımı ile birlikte anjiyogenez üçüncü gün başlar. 7 ve 10. Günler arasında intramembranöz kemikleşmede hücre proliferasyonu tepe noktasına ulaşmış, kırık oluşumu ve endokondral kemikleşme başlamıştır. 14. Günde hücre proliferasyonu kesilir fakat osteoblastik aktivite devam eder. Yumuşak kalkanın mineralizasyonu, kırığın rezorbe olup yeni kemiğin oluşumu 21. güne kadar devam eder. Bu safha kemikleşmenin en aktif safhasıdır. 21. günde kemik remodelizasyonu başlar, lameller kemik oluşur. Serebral yaralanma, miyokardiyal iskemi/infarkt, kas distrofilileri ve kemik kırıkları ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları MSC'lerin intravenöz enjeksiyonu veya lokal uygulamalarında

yaralanma bölgesine ulaşarak gerekli hücre tipine dönüşebildiğini göstermiştir. MSC'nin osteosit ve kondrosite dönüşebildiğini gösteren *in vitro* çalışmalar ışığında doku tamiri ile ilgili birçok *in vivo* çalışma yapılmaktadır. Değişik cins birçok hayvanda kritik büyüklükte kemik defektlerinin tamirinde MSC kullanılmıştır. Mezenşimal dokuların genetik bir bozukluğu olan osteogenezis imperfektalı radyasyonamara bırakılmış farelere sağlıklı kemik iliğinden alınmış stromal hücreler aşılandığında transplante edilen hücrelerden fonksiyonel kemik ve kırık formasyonu olduğu tespit edilmiştir[40]. Benzer şekilde osteogenezis imperfektalı çocuklara kemik iliği hücreleri aşılandığında yan etki görülmemesi bir yana üç ay sonra osteoblast sayısında, yeni lameller kemik oluşumunda ve tüm vücut mineral içeriğinde artış sağlanmıştır. Bunlara ek olarak kırık frekansı azalmış, vücut büyüme oranı artmıştır [13, 40].

Shirley ve ark. yaptıkları çalışmada florasan ile işaretledikleri kök hücreleri tavşanlara sistemik olarak vermişler, bu hücrelerin kemik kırığının iyileşmesinde rol aldıklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışma, iyileşmeye katılan bazı osteoblastların kemik kırığından uzak bölgelerdeki kemik iliğinden göç ederek kırık bölgesine gelen kök hücrelerden kaynaklandığını kanıtlamaktadır.

Tümör, travma ve deformitelere bağlı kemik defektleri maksillofasiyal cerrahlar için önemli bir problem olmaktadır. Büyük ve kompleks morfolojideki defektler klinik zorluklara neden olmaktadır. Her ne kadar otojen greftler altın standartta da olsa yetersiz kemik hacmi, donör saha komplikasyonları, deformiteleri ve rahatsızlıkları nedeniyle limitleri kısıtlıdır. Doku mühendisliği; bilimsel prensipleri uygulayarak biyomateryaller, hücreler ve faktörleri birlikte veya ayrı ayrı kullanarak yasayan dokuların tasarımı, yapımı, modifikasyonu ve gelişimini sağlamaktadır. Osteogenezisi artırmak için hücreler verici sahada herhangi bir olumsuzluğa yol açmadan bir çok otolog kaynaktan alınabilmektedir. Alınan az sayıda hücre doku mühendisliği yöntemleri ile çok büyük sayılara ulaştırılabilmektedir. Günümüzde kraniofasiyal rejenerasyonda kök hücre kullanımı ile ilgili bir çok hayvan çalışması yapılmaktadır [40, 43].

2.8. Kemik Morfogenetik Proteinler

Kemik morfogenetik proteini ilk olarak 1965 yılında Urist tarafından tanımlanmıştır. Embriyojenik ve doğum sonrası dönemde kemik ve birçok dokuda var oldukları belirlenmiştir [44].

Kemik morfogenetik proteinler osteojenik proteinler olarak adlandırılmakla beraber, transforming growth faktor- β ailesi üyeleri içinde bulunan büyüme ve farklılaşma faktörleridir [45, 46].

Tablo 2.1. İnsan Kemik Morfogenetik Proteinleri ve Temel Fizyolojik Özellikleri

BMP	Adlandırma	Temel Rolü
BMP-2	BMP-2a	Kemik ve kıkırdak morfogenezi ve kalp oluşumu
BMP-3	Osteogenin	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar
BMP-3b	GDF-10	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar
BMP-4	BMP-2b	Kemik ve kıkırdak morfogenezi ve böbrek oluşumu
BMP-5	-	Kemik morfogenezi ve ekstremiteler oluşumu
BMP-6	Vrg1, Dvr6	Kemik ve kıkırdak morfogenezinde hipertrofi
BMP-7	OP-1	Kıkırdak ve kemik morfogenezi ve böbrek formasyonu
BMP-8	OP-2	Kemik morfogenezi/ spermatogenez
BMP-8b	OP-3	Spermatogenez
BMP-9	GDF-2	Kemik morfogenezi ve kolinerjik nöronların oluşumu
BMP-10	-	Kalp morfogenezi
BMP-11	GDF-11	Aksiyal iskelet, Göz, Böbrek ve pankreas gelişimi
BMP-12	CDMP-3, GDF-7	Tendon, Ligament ve duyu nöronlarının gelişimi
BMP-13	CDMP-2, GDF-6	Kıkırdak gelişimi ve hipertrofi
BMP-14	CDMP-1, GDF-5	Kondrogenez ve anjiyogenez
BMP-15	GDF-9b	Yumurta fizyolojisi
BMP-16	-	Embriyonik gelişim
BMP-17	-	Embriyonik gelişim
BMP-18	-	Embriyonik gelişim

Kemik morfogenetik proteinler aminoasit diziliş benzerliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır Günümüzde 15 adet kemik morfogenetik proteini

tanımlanmıştır (Tablo1). Bu proteinler arasında osteoindüktif özelliği en fazla olan kemik morfojenetik proteini- 2'dir (BMP-2)[44].

BMP-2 ve 4 birinci alt grubu, BMP 5 ve 8 ikinci alt grubu, BMP 3 ve GDF-10 üçüncü alt grubu oluşturmaktadır. BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7'ler de, BMP-2'ye benzer şekilde kemik indüksiyonu yapmaktadır. Bu proteinler arasında bone morfojenetik protein-2'nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür. Embriyogenik hücrelerin BMP'lere cevap vererek kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşması da, BMP'lerin embriyogenik iskelet sisteminin oluşmasında rol oynadıklarını göstermektedir [44].

Membranöz kemik iyileşmesinde ilk iki hafta BMP-2 ve BMP-4 en yoğun gözlenen türevlerdir. Özellikle osteotomi hattına yakın periosteal hücrelerde ve osteotomi nedeni ile oluşan defektteki mezenkimal hücrelerde zamanla defektin kapanma aşamasında yeni oluşan kemik adacıklarındaki aktif osteoblastlarda BMP-2 ve BMP-4 ekspresyonuna rastlanmaktadır. İn-vitro koşullarda mezenşimal hücrelere BMP uygulandığında matriks üretiminde, alkalen fosfataz düzeyinde ve tip I kollajen sentezinde artış gözlenir. Ancak mezenşimal hücrelerde sayıca artış olmaz. Bu nedenle BMP'ler daha çok morfojen ajan olup mitojen olarak görev yapmazlar. Kemik iyileşmesinde BMP'ler pluripotent kök hücrelerinin osteoblastik dönüşümünde rol alırlar.[47, 48] Bu sayede farklılaşmamış mezenşimal hücreler osteojenik hücrelere dönüşerek yeni oluşan kemiğin ekstraselüler matriksinin sentezlenmesinde ve kalsifikasyonunda görev alırlar. Ayrıca BMP'ler, olgun osteoblast ve kemik iliği osteoprogenitör hücreleri üzerinde kemotaktik özelliğe sahiptir [44].

Kemik yaralanmasının mezenkimal hücreleri etkilediği ve bu hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmelerini sağlayacak mekanizmayı tetiklediği düşünülmektedir. Literatürde kemik yaralanması sonrasında yapısı bozulan kemikten veya rezorbe olan matriksten ortama salınan kemik morfojenic proteinlerin bu mezenkimal hücre göçünde rol oynadıkları savunulmaktadır. Mezenkimal hücreler yaralanma bölgesinde proliferasyonla diferansiyasyonlarını tamamlayarak osteoblastik hücrelere dönüşürler [49]. Yeni gelişen osteoblastik hücrelerden üretilen BMP'ler bu döngüyü kuvvetlendirerek kemik iyileşmesini hızlandırır [50].

Son yıllardaki araştırmalar BMP'lerin lokal konsantrasyonlarının artırılmasının kemik iyileşmesindeki etkileri üzerine sürmektedir [10, 51]. İster dışarıdan ortama BMP katılsın isterse de gen terapisi ile lokal BMP düzeyi arttırılsın sonuçta kemik kırıklarında iyileşme hızlanmaktadır [52]. Ayrıca iyileşmenin zor olduğu kritik büyüklükteki defektlerde ve nonunionlarda da klinik düzelme kaydedilmektedir [15, 53]. Bu nedenle klinikte de ekzojen BMP kullanımı kemik defektlerinin tedavisindeki başarıyı arttırırken morbiditeyi de düşürecektir [10].

BMP *in-vivo* ortamda çözülebilir olduğundan dolayı implantasyondan kısa bir süre sonra ortamdan uzaklaşmaktadır. Taşıyıcı bir materyal olmadan BMP'nin büyük oranlarda kemik formasyonu indüksiyonu yapması bu sebepten dolayı mümkün olmamaktadır. Klinik uygulamalarda hızla konsantrasyonu azalacağı veya proteolitik enzimler ile ortadan kaldırılacağı için BMP'lerin su-bazlı sulüsyonlar ile topikal kullanımı mümkün değildir. Bu nedenle sabit doku konsantrasyonunun sağlanabilmesi için BMP'ler kollajen, polialfahidroksi asit, kalsiyum fosfat polimerleri, deproteinize sığır kemiği ve titanyum gibi taşıyıcılara yüklenerek uygulanmaya çalışılmaktadır [54]. Yapılan çalışmalarda uygulanan pek çok taşıyıcının ilk 24 saatte BMP'lerin hızla salındığını ortaya koymuştur. Ancak polimer yapısındaki taşıyıcılar BMP'lerin kontrollü salınımın da başarılı olduğunı gösterilmiştir [55, 56].

BMP'lerin heterotopik bölgelerde endokondral yol ile kemik formasyonu indüksiyonu yaptığı birçok hayvan çalışmasında gösterilmiştir. BMP'lerin uygun bir taşıyıcı ile implante edildikleri zaman; undiferansiye mezenşimal hücrelerin kemotaksis ile aktive edilerek migrasyonlarına ve osteoblastlara dönüşmelerine, kemik matriksi depolanmasına, yeni depo edilen kemik matriksinin mineralizasyonuna ve kemik iliği diferansiyasyonuna neden oldukları gösterilmiştir [57].

Günümüzde rekombinant insan kemik morfojenetik protein-2'nin (rhBMP-2) çoğunluğu "chinese hamster over hücreleri" kullanılarak elde edilmektedir. *Esherichia coli* veya chinese hamster over hücreleri kullanılarak elde edilen rhBMP-2'nin osteoindüktif özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda iki proteinin indüktif aktivitelerinin benzer olduğunı görülmüştür [15, 16].

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için klinik kullanımda kemik morfojenetik proteini en umut verici biyomateryallerden birisidir. Bundan dolayı osteoindüktif özelliği en güçlü olan kemik morfojenetik proteini-2'nin çeşitli bölgelerde ve çeşitli dozlarda kemik oluşumunu başlatıcı özelliklerinin ortaya konması için çeşitli deneysel ve klinik araştırmalar devam etmektedir [10, 15].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmadaki cerrahi işlemler, Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanlar laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kemik stromal hücrelerin BMP-2 transfeksiyonu Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doku Mühendisliği Bölümünde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan rat kemik stromal hücreleri Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmanın histomorfometrik değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı'nda, mikroCT incelemeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yapılan kan ALP değerlendirilmeleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında incelemeye tabii tutulmuştur. Gen ekspresyonu çalışmaları da Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik A.D.nda yapılmıştır.

Çalışmanın etik kurul onayı "Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu"ndan (2011/52-1 karar numarası ile) alınmıştır.

Çalışmada 250-300 g ağırlığında, toplam 39 adet dişi Wistar-Albino rat kullanılmıştır. Denekler Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanlar ünitesinden temin edilmiştir. Çalışmada aynı çevresel ortamda yetiştirilmiş, ratlar kullanılmıştır. Deneysel öncesi 20-21 °C sıcaklıkta 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritmine tabii tutulup ratların anestezi uygulamasından 2 saat öncesine kadar gıdaya serbest erişimleri sağlanmıştır. Deneysel hayvanı olarak ratın seçilme nedeni, yapılacak deneysel karmasık yapısı ve planlanan cerrahi yöntemin kolay uygulanacağı, filogenetik açıdan en basit tür olmasıdır. Ayrıca bu türün temin ve bakım maliyetinin düşük olması da diğerk bir nedendir. Ek olarak ratın uygulanacak cerrahiye en iyi tolere edeceği düşünülerek denek olarak tercih edilmiştir.

3.1. Deneysel Grupları

Otogreft grubunda toplam 7 adet, BMP-2 Transfeksiyon grubunda toplam 14 adet, diğerk grupların her birinde toplam 6 adet olmak üzere negatif kontrol grubu

dahil toplam beş deney grubu oluşturulmuştur. Tüm deneklerde 6 mm'lik kranial defekt oluşturulduktan sonra gruba spesifik işlem yapıp dördüncü haftada BMP-2 Transfeksiyon grubundan 6 adet, diğer her bir gruptan 3 adet ve 16. Haftada Otogreft grubundan 4 adet, BMP-2 Transfeksiyon grubundan 8 adet, diğer her bir gruptan 3 adet olmak üzere tüm ratlar sakrifiye edilip gerekli histolojik, biyokimyasal ve radyolojik incelemeye tabii tutulmuştur.

Kontrol Grubu: Kontrol grubunda toplam 6 adet rat kullanılmıştır. Bu grupta 6 mm'lik kranial kemik defekti oluşturulduktan sonra defekt onarımı için ek bir işlem yapılmadan sekonder iyileşmeye bırakılmış, gruptaki ratların 3 adeti 4. Haftada geri kalan 3 adeti ise 16 haftada sakrifiye edilerek incelemeye tabii tutulmuştur.

Boş Scaffold Grubu: Bu grupta da toplam 6 adet rat standart kranial defekt oluşturulduktan sonra, kranial defekt içerisine jelatin sponge (GelSpon-P ®) yerleştirilerek 4. Haftada 3 adet, 16. Haftada 3 adet olmak üzere toplam 6 denek sakrifiye edilip incelemeye tabii tutulmuştur.

Otogreft Grubu: Toplam 7 adet rat bu gruba dahil edildi. Standart oluşturulan kranial defekt sonrası, oluşan defekt çıkartılan kemik parçası ile tekrar onarılıp 4. Haftada 3 adet ve 16. Haftada 4 adet olmak üzere toplam 7 denek sakrifiye edilip gerekli incelemeler yapılmıştır.

Stromal Hücre Grubu: Bu grupta toplam 6 adet rat kullanıldı. Daha önce rat femurundan izole edilip çoğaltılan kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreleri cerrahi esnasında, 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesine, mikropipet ile 50 mikrolitresinde 1.000.000 hücre olan medium emdirilerek yerleştirildi ve daha sonra standart olarak oluşturulmuş olan kranial defekt içerisine bu kök hücre emdirilmiş scaffold yerleştirildi. Onarım sonrası 4. Haftada 3 adet ve 16. Haftada 3 adet olmak üzere ratlar sakrifiye edildikten sonra gerekli incelemeler yapıldı.

BMP-2 Transfeksiyon grubu: Bu grupta toplam 14 adet rat kullanıldı. BMP-2 transfekte kemik stromal hücreleri cerrahi girişim ile hazırlanan defekte birebir uyan 6 mm çaptaki jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesine (mikropipet ile 50 mikrolitresinde) 1.000.000 hücre içeren medium ile emdirildi. Daha sonra bu scaffold standart olarak oluşturulmuş kranial kemik defekti içerisine yerleştirildi.

Postoperatif 4. Haftada 6 ve 16. Haftada 8 adet olmak üzere tüm ratlar sakrifiye edildi ve incelemeye tabii tutuldu.

3.2. Kalvaryal Defekt Oluşturulması

İntraperitoneal ketamin (Ketalar®, 500mg 10ml flakon Pfizer; 90 mg/kg) ve ksilazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Almanya; 10 mg/kg) ile genel anestezi uygulandıktan sonra, kraniyumun dorsal kısmı traş edilip lokal antiseptikler ile temizlik sağlanıp örtülmüştür (Resim 31).



Resim 3.1. Kraniyal defekt için ameliyat bölgesi

Sagital strden uzak bir C insizyon ile kesi yapıldıktan sonra deri, subkutan doku ve periost kaldırılıp parietal kemiğe ulaşılmıştır (Resim 3.2, 3.3).



Resim 3.2. Kraniyal defekt oluşturmak için İnsizyon

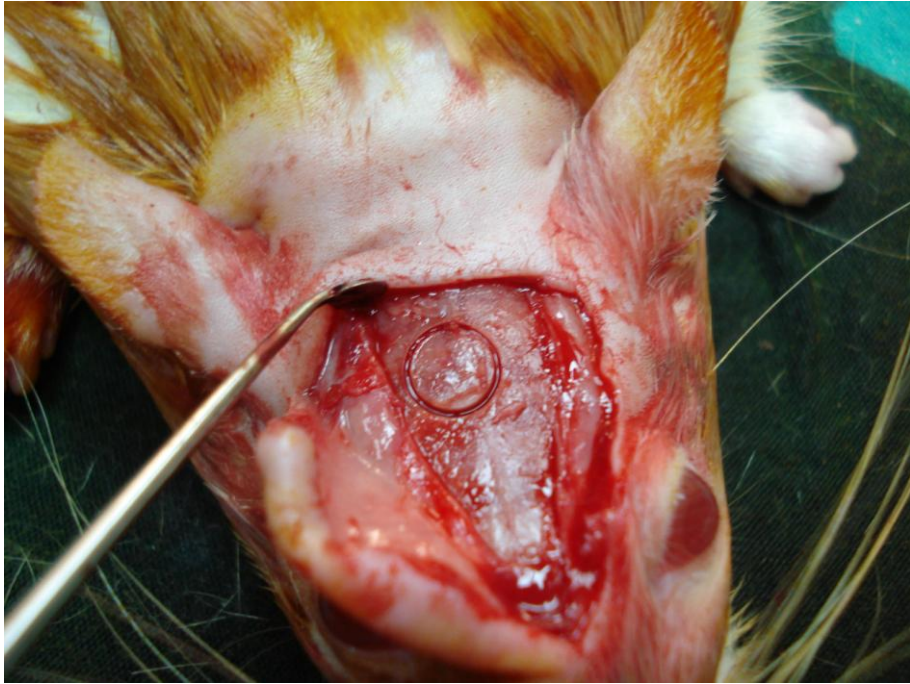


Resim 3.3. Subkutan doku ve periostun flep Őekliinde kaldırılması

Bu işlemlerin ardından 6mm çaplı döner testere kullanılarak kalvaryal kemikte 6 mm çapında standart boyutta kemik defekti oluşturulmuştur (Resim 3.4, 3.5, 3.6).



Resim 3.4. Kemik defektinin oluşturulması



Resim 3.5. Kemik defektinin oluşturulması

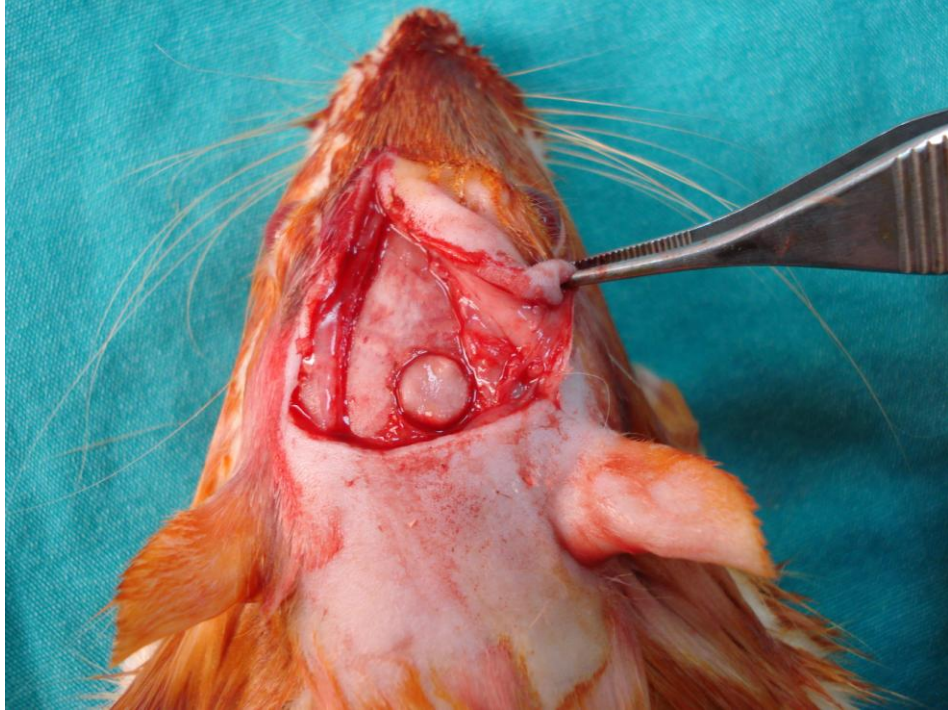


Resim 3.6. Standart Kalvaryal Defekt

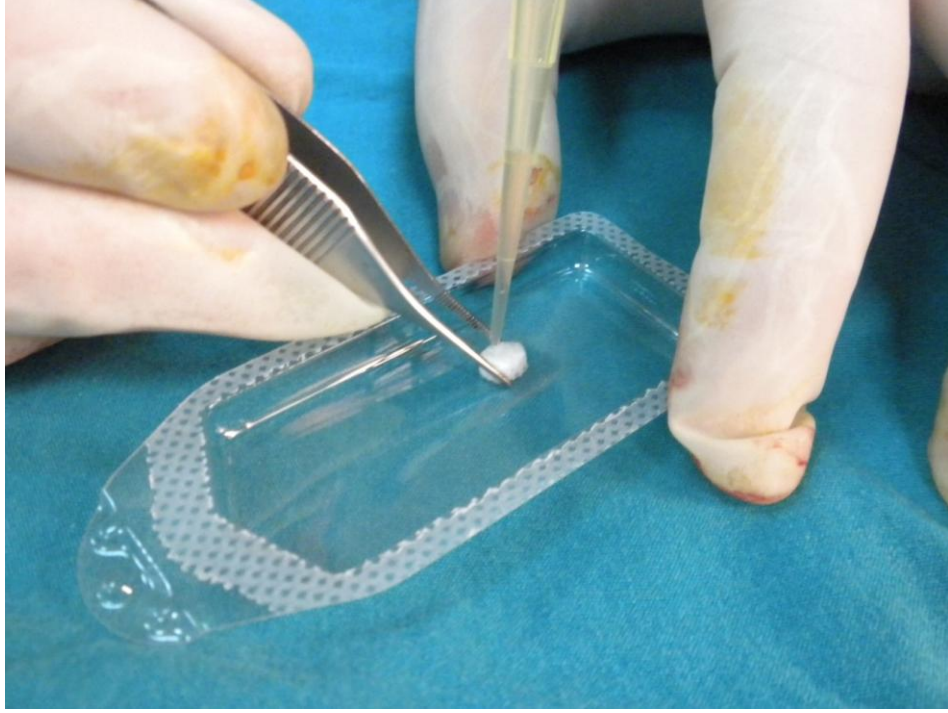
Kontrol grubunda 6 mm'lik kalvaryum defekti oluşturulduktan sonra bu kısım boş bırakılmıştır Otogreft grubunda ise aynı yöntemle kaldırılan 6 mm çaplı kemik grefti yerine iade edilerek otogreft ile onarım gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarına ise hazırlanmış 6 mm çapındaki doku iskeleleri (jelatin sponge doku iskelesi, jelatin sponge + kemik stromal hücre yüklenmiş doku iskelesi, jelatin sponge + kemik stromal hücre ve BMP-2 plazmid yüklenmiş doku iskelesi) defekti tam dolduracak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 3.7, 3.8, 3.9).



Resim 3.7. Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması



Resim 3.8. Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması



Resim 3.9. Kemik stromal hücre ve BMP-2 plazmid yüklenmiş doku iskelesi

Başlangıçta kaldırılan sub-periosteal flepler tanımlandığı şekilde 6/0 ipek (nonabsorbable suture) ile kapatılıp işleme son verilmiştir (Resim 10).



Resim 3.10. Kranial Defektin son hali

3.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması

Scaffold olarak gelatin sponge seçildi. (GelSpon-P ®) Defekte yerleştirilecek doku iskeleleri; dermatom bıçağı ile 3 mm. kalınlıkta split edilen jelatin köpük plakadan 6mm. çapında punch biyopsi bıçağı yardımıyla hazırlandı.



Resim 3.11. Scaffoldun hazırlanması

3.4. Örneklerin Alınması

İntraperitoneal ketamin (Ketalar®, 500mg 10ml flakon Pfizer; 90 mg/kg) ve ksilazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Almanya; 10 mg/kg) ile genel anestezi uygulandı. Transtorasik perkütan enjektör yardımıyla ratlardan intrakardiyak 5cc. kan alındı. Ratlara daha sonra karbondioksit gazı ile ötenazi uygulandı. Sakrifikasyon sonrası histolojik örnek almak için frontalden başlayan

temporoparyetal bölgeden kavisi yaparak geçen ve servikotorakal bölgede sonlanan cilt ve cilt altı kesisi yapıldı.



Resim 3.12. Örnek alınma işlemi görüntüsü

Daha sonra cilt flebi diseke edilerek cranium ve servikal bölge ortaya kondu. Kraniumdaki temporal kaslar bilateral kaldırıldı.

Aynı şekilde oksibital bölgede oksibital kemiğe insersiyoy yapan kaslar ve ligamanlar serbestleştirilerek foremen magnum ortaya kondu. Tel kesme makası yardımıyla foremen magnumdan başlayarak bilateral temporal ve frontal kemik kesildi ve histolojik örnek alındı. Daha sonra histolojik örnekler formaldehit solusyonuna yerleştirildi.



Resim 3.13. Örneğin üstten görüntüsü

3.5. Kemik İliği Kök Hücrelerinin İzolasyonu

Genel anestezi altındaki erkek ratların femur ve tibiası çıkartılmıştır. Femur ve tibia, %5 penisilin/streptomisin (Sigma, Almanya) bulunan DMEM-F12 Ham's (Sigma, Almanya) içerisinde (taşıma ortamı) hücre kültür laboratuvarına getirilmiştir. Laminer akış kabini içerisinde femur ve tibia içeriği taşıma ortamı ile yıkanmıştır. Hücreler 1200 rpm de 5 dakikada 2 kez yıkanmıştır. 25 cm² lik Petri kaplarına 1x10⁵ hücre/cm² yoğunlukta hücre, %20 FBS (Fetal Sığır Serumu) (Sigma, Almanya), %1 penisilin/streptomisin/gentamisin ve 2 mM glutamin (Sigma, Almanya) bulunan DMEM-F12 Ham's içerisinde 37 °C de %5 CO₂ içeren inkübatör içerisinde kültür edilmiştir. Kültür kabına 48 saat sonra yapışmayan hücreler uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edilmiştir. Kültür ortamları 3-4 günlük arayla değiştirilmiştir. %70–80 konflüent olan kültür kabındaki hücreler, %0,25 Tripsin/EDTA (Sigma, Almanya) kullanılarak kaldırılmıştır. Trypan mavisi ile canlılık ve hücre sayısı hesaplanmıştır. Kültürlere pasaj 4'e kadar devam edilmiştir.

Hücreler insülin enjektörü içerisinde, deney için hazırlanmış olan hayvana enjeksiyon için hazır hale getirilmiştir.

3.6. Transfeksiyon Çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında hücrelerin BMP2 (Kemik morfojenik protein 2) ile genetik modifikasyonu için daha önce yapılan çalışmalardaki protokoller (Odabaş; 2012) izlenmiştir. Bu kapsamda non-viral polimerik taşıyıcı olarak Turbofect (Fermantas / ABD) adlı lipofilik taşıyıcı satın alınmıştır. Transfeksiyon için hücreler transfeksiyon öncesi 24 kuyucuklu plaklara 5×10^4 hücre / ml olarak şekilde ekilir ve 1 gün boyunca %10 Fetal Sığır Serumuna %0,5 Antibiyotik içeren DMEM/F12 Hams besiyeri içerisinde 37°C %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra Fermantas firmasının Turbofect için verdiği prosedür izlenerek transfekte edilmiştir. İzlenen prosedür aşağıda verilmiştir.

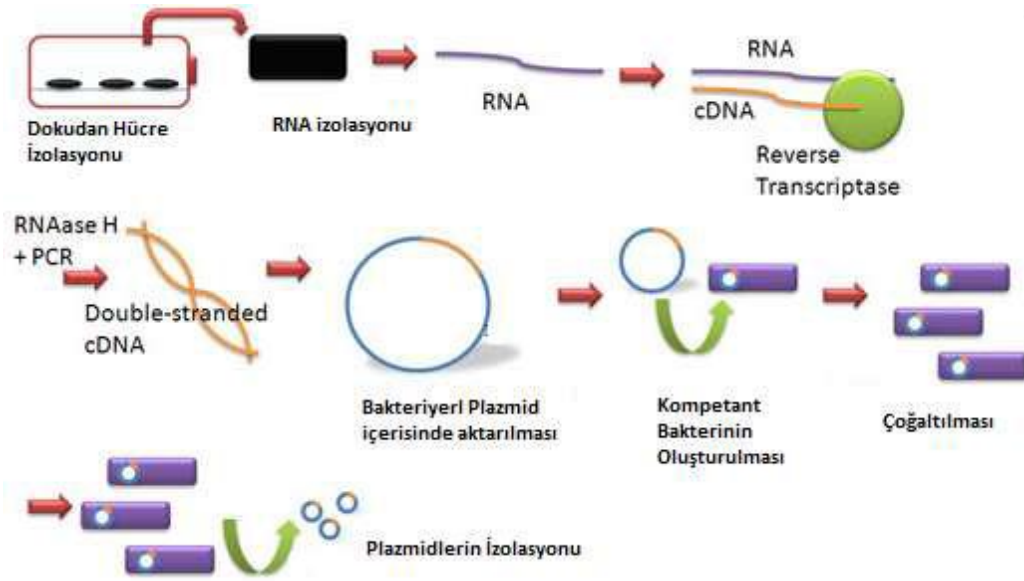
“Turbofect” ile genel transfeksiyon protokolü

- 1) 24 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^4 hücre olarak şekilde ekim yapılır. (Her bir kuyu için)
- 2) 1 gün sonra hücreler %70 kaplanmış hale geldiğinde transfeksiyon işlemlerine geçilebilir
- 3) $1 \mu\text{g}$ DNA ile $100 \mu\text{l}$ kültür ortamı karıştırılır.
- 4) $2 \mu\text{l}$ Turbofect çözeltisi DNA çözeltisi 'ne eklenir.
- 5) 15-20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyona bırakılır.
- 6) $100 \mu\text{l}$ Turbofect-DNA kompleksi karışımını kültür kabına eklenir.
- 7) Üzerine 1 ml kültür ortamı eklenir ve hafif çalkalanır.
- 8) 37°C 'de inkübasyona bırakılır ve ekspresyon sonuçları izlenir.

3.7.Gen Ekspresyonu Çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında kullanılacak olan, memeli hayvan hücrelerinde BMP-2 proteinin ekspresyonunu sağlayacak olan plazmid DNA"nın hazırlanma çalışmaları Avusturya Viyana" da bulunan Ludwig Boltzman Enstitüsü"nde Prof.

Dr. Heinz Redl ve grubu ile ortak olarak Redl grubunun çalışmaları temel alınarak yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Plazmid Klonlama Basamakları

Temel işlem basamakları;

- Primer tasarımı
- Primer template etkileşimi
- Ligasyon, Transformasyon ve Ekspresyon çalışmaları
- Kontrol ve DNA ekstraksiyonu
- Sekans analizi
- *In vitro* ekspresyon çalışmaları

Tüm gen ekspresyon çalışmaları Hacettepe üniversitesi Kimya mühendisliği anabilim dalı tarafından yürütülmüştür.

Gen ekspresyonunda toplam 4 grup rat kullanılmıştır. Her bir grupta 4 adet olmak üzere toplam 24 rat kullanılmıştır. Gruplar kontrol grubu,boş jelatin sponge grubu,BMP-2 transfeksiyon ve oto greft grubu olarak belirlenmiştir.

3.8. Radyolojik Değerlendirme

Deney gruplarındaki ratların 4. Haftadaki ve 16. Haftadaki genel anestezi altında gerçekleştirilen sakrifikasyonları sonrası, kraniyal defektleri Hacettepe üniversitesi Tıp Fakóltesi Anatomi Anabilim Dalında MicroCT (MikroCT SKYSCAN 1174) ekilerek kemik iyileşmesi değerlendirilmiştir.

Formolda 5 g¼n örnekler bekletildikten sonra mikro CT çekimleri yapıldı. Örnekler cihaza yerleştirildikten sonra;

- Resolution: 21 mikrometre
- Rotation step: 0,50
- Averaging (frames): 2
- Update flat-field before scanning, seçeneği işaretleniyor.
- Partial width: 100%

ekim ayarları ile gr¼nt¼leme yapıldı.

Ham tomografi gr¼nt¼leri NRecon (Skyscan, Belçika) yazılımı ile tomografik kesitlere dn¼řt¼r¼ld¼. Image J isimli açık kaynaklı bir gr¼nt¼ işleme yazılımı için yazılmış olan bir plugin yardımı ile her bir kesitteki kemik boşluğunu kaplayan dairesel bir alan çizildi. Her bir kesitteki alan interpolate edilerek hacimsel olarak kemik boşluğuna k¼resel analiz hacmi yerleştirilmiş oldu. Bu k¼resel hacim içinde kalan ve belli bir yoğunluğa ulaşmış olan remineralizasyon kısımlarının hacimleri hesaplandı.

3.9. Histoloji ve Histomorfometri

Deney gruplarındaki ratların 4. Haftadaki ve 16. Haftadaki genel anestezi altında gerçekleştirilen sakrifikasyonları sonrası, kraniyal defektleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji Anabilim Dalında incelenmiştir. Kalvariyal kemik örnekleri %10'luk tamponlanmış ntrel formalin ozeltisinde tespit edildikten sonra 1 ve 4 aylık örnekler mikrotomografiye gönderildi. Mikrotomografi sonrası rnekler De Castro ozeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) kontroll¼ olarak dekalsifiye edildi ve sabit vakumlu otomatik doku takip cihazı ile izlenerek parafine

gömüldü. Her bloktan beş mikrometre kalınlığında yirmi kesit alınarak ardışık olarak her kesit hematoksilin eozin (HE) veya Masson trikrom (MT) ile boyandı. MT ile kompakt kemiğin kırmızı, osteoid ve kırıkdağın yeşil, hücre sitoplazmalarının eflatun boyandığı yüksek kontrastlı görüntüler elde edildi. Kalvariya defekt alanı, bilgisayar ve dijital kamera (Leica DFC 480, Westlar Almanya) bağlantılı Leica DMR (Westlar Almanya) marka ışık mikroskopunda görüntüledikten sonra defekt alanı en küçük büyütmede saklanıp Qwin plus marka (Leica, Westlar Almanya) görüntü analiz programı ile kantitatif olarak değerlendirildi. Defektteki yeni kemik alanı iki şekilde kantitatif olarak hesaplandı. İlk olarak yeni kemik alanı MT ile boyalı 10 kesitte total milimetre kare olarak ölçülerek normalize edilen değer kaydedildi. İkinci olarak ölçülen yeni kemik alanı total defekt alanına oranlanarak elde edilen oran yüzde olarak kaydedildi [58, 59].

3.10. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Deney gruplarındaki ratların 4. Haftadaki ve 16. Haftadaki genel anestezi altında gerçekleştirilen sakrifikasyonları sonrası, alınan kan numuneleri santrifüj edildikten sonra -80 °C saklanıp Kırıkkale üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Rat Spesifik ALP kiti (Rat Bone alkaline phosphatase) BALP ELISA Kit, (China) kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS 17 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Bağımsız değişkenler gruplar, bağımlı değişkenler histolojik, biyokimyasal ve mikrotomografik ölçümlerdir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı ve varyansların homojenliği Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Tüm veriler parametrik olmayan testlerle (çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için posthoc Dunn testi) değerlendirildi. Spearman korelasyon testiyle biyokimyasal, mikrotomografik ve histolojik verilerin korelasyonu değerlendirildi. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle temsil edildi. Fark, p 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Çalışma süresince tüm gruplardaki ratlarda uygun anestezi ve cerrahi prosedür altında deney protokolü tamamlanmıştır. Çalışma süresince anesteziye bağlı veya postoperatif bakım esnasında denek kaybı gözlenmemiştir. Yapılan çalışmada deneklerin hiçbirinde yara yeri enfeksiyonu, fistül, greft enfeksiyonu gözlenmemiştir.

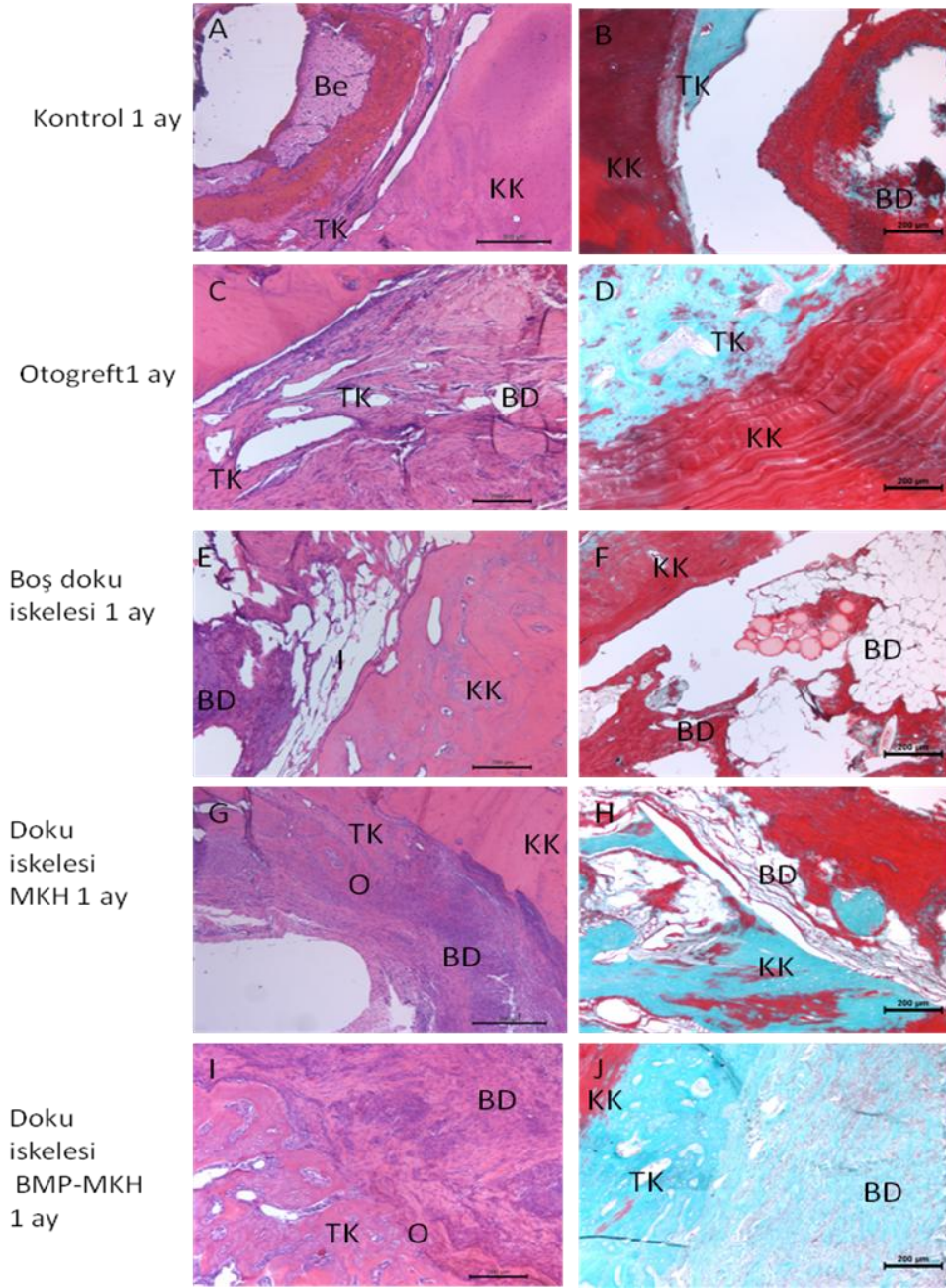
4.2. Histopatoloji-Mikrotomografi ve Biyokimyasal Bulgular

Birinci ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.016$) ve mm² cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.016$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Mikrotomografi ve kan ALP değerleri bu dönemde gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Mikrotomografi ve ALP'ın değişmemesi, ilk ayda kritik boyuttaki defektin kemikleşmenin erken evresinde olması nedeniyle adı geçen ölçümlerin anlamlı değerlere ulaşamadığı biçiminde yorumlandı. Birinci ayda BMP ile transfekte MKH uygulanan gruptaki yeni oluşan kemik alanı ve total defekte oranı, defektin boş bırakıldığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı. (sırasıyla $p=0.034$ ve $p=0.034$) Yine birinci ayda otograft grubundaki yeni kemik alanı ve bu alanın total defekt alanına oranı boş bırakılan defekt grubuna göre anlamlı biçimde fazlaydı (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$). Bu dönemde BMP ile transfekte hücre uygulanan grupla otograft grubu karşılaştırıldığında ise yeni kemik alanı ve oranı otograft grubunda daha fazlaydı (sırasıyla $p=0.039$ ve $p=0.039$) şekil 4.1, 4.2, Resim 4.1, 4.2).

Dördüncü ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.005$) ve mm² cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.005$) ile birlikte mikrotomografik ölçüm değerleri

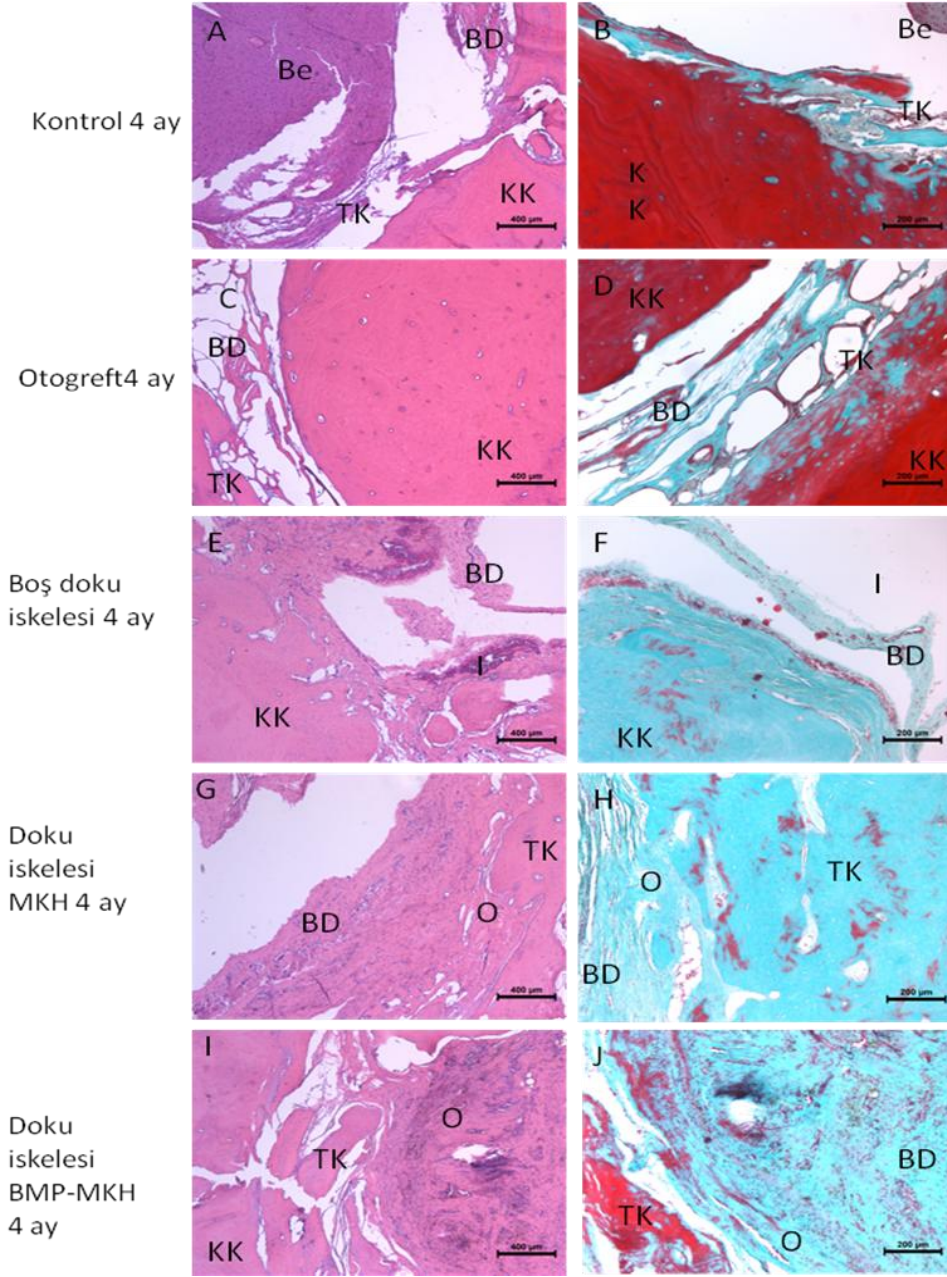
($p=0.008$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Bu dönemde mikrotomografi değerleriyle histolojik yeni kemik alanı ölçümleri bazı gruplarda hafif ile orta derecede korelasyon ($p<0.005$) gösterdi. Dördüncü ayda otograft uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı ve bunun defekt alanına oranı; boş bırakılan defekt grubu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$), boş doku iskelesinin uygulandığı grup (sırasıyla $p=0.002$ ve $p=0.002$) ve BMP ile transfekte MKH uygulanan gruba göre (sırasıyla $p=0.041$ ve $p=0.041$) daha çoktu. Diğer yandan dördüncü ayda BMP ile transfekte edilmiş MKH uygulanan gruptaki yeni kemik alanı, boş defekt grubuna göre anlamlı biçimde daha çoktu ($p=0.045$). Dördüncü ayda mikrotomografik olarak defekt alanında ölçülen kemik hacmi otograft grubunda, MKH ve BMP ile transfekte MKH uygulanan gruplara göre daha çoktu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.004$) (Şekil 4.1, 4.2, Resim 4.1, 4.2). Buna göre dördüncü ayda BMP ile transfekte edilmiş MKH'ler histolojik ve tomografik olarak kalvariyal defekte iyileşme sağlasa da, altın standart olan otograft uygulamasının diğer gruplara göre daha ileri kemikleşme sağladığı sonucuna varıldı.

Doku iskelesi (scaffold) uygulanan gruplarda biyomalzemeye hafif ile orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Daha önce biyomalzemenin doku uyumu başka çalışmalarımızda kantitatif olarak değerlendirilip biyoyumlu olarak saptandığından, bu çalışmada skorlanmamıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte nekroza rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman dilimlerinde otograft uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı en ileri seviyededir. BMP ile transfekte MKH uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı altın standart olan otograft uygulamasına yakın düzeyde belirgin biçimde artmıştır (Resim 4.1, 4.2, Şekil 4.1). Buna rağmen grupların hiçbirisinde dördüncü ayda kritik büyüklükteki kalvariyal defekt tam olarak kemikleşmemiştir. Bu durum literatür ile uyumludur.



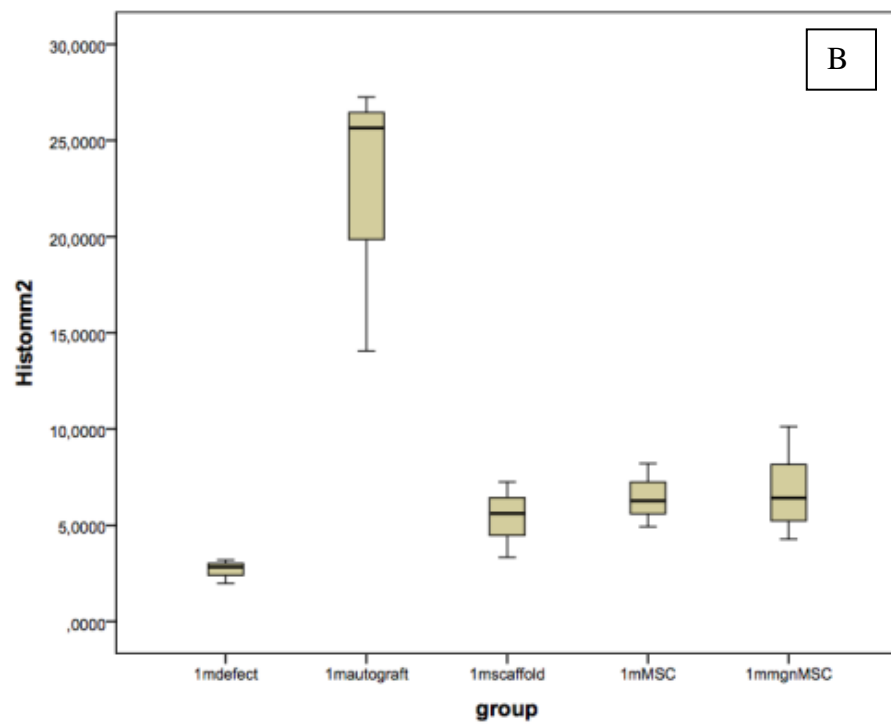
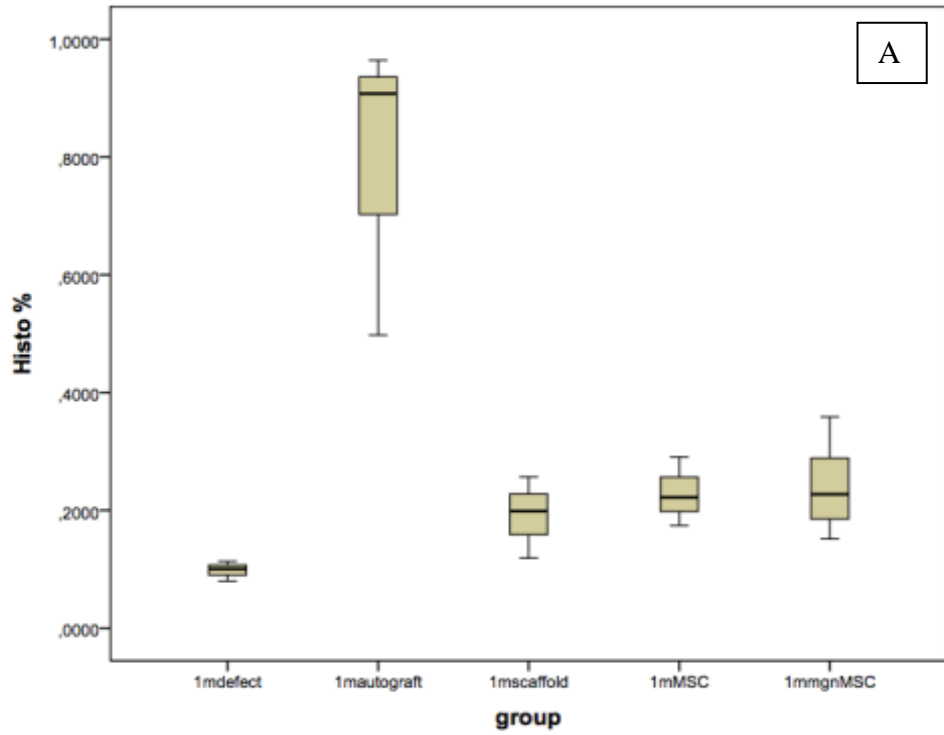
Resim 4.1. Birinci ay histolojik görüntüler

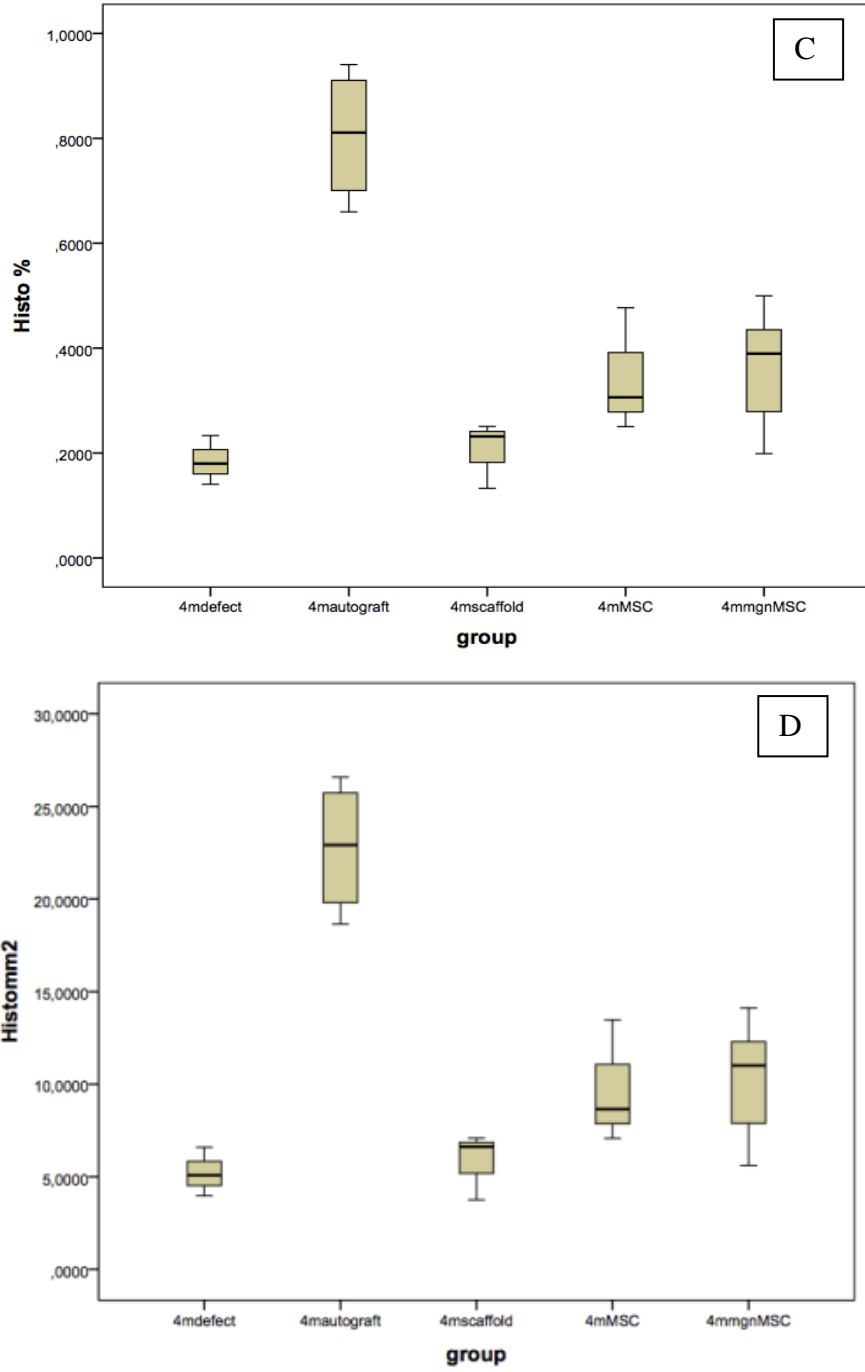
Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 1 aylık kalvariye defekt alanına ait mikrograflardır. Otogreft, doku iskelesi-MKH ve doku iskelesi-BMP ile transjekte MKH uygulanan gruplarda kavitenin iyi organize olmuş bağ dokusu ile dolu olduğu ve yeni kemik miktarının kontrole göre daha iyi gelişmiş olduğu izlenmektedir. Doku iskelesi gruplarında biyomalzeme uygulanan alanlar takip sırasında eridiklerinden yerlerinde boşluklar kalmıştır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, I: Doku iskelesi, O: Osteoid, K: Kıkırdak, Be: Beyin, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom



Resim 4.2. Dördüncü ay histolojik görüntüleri

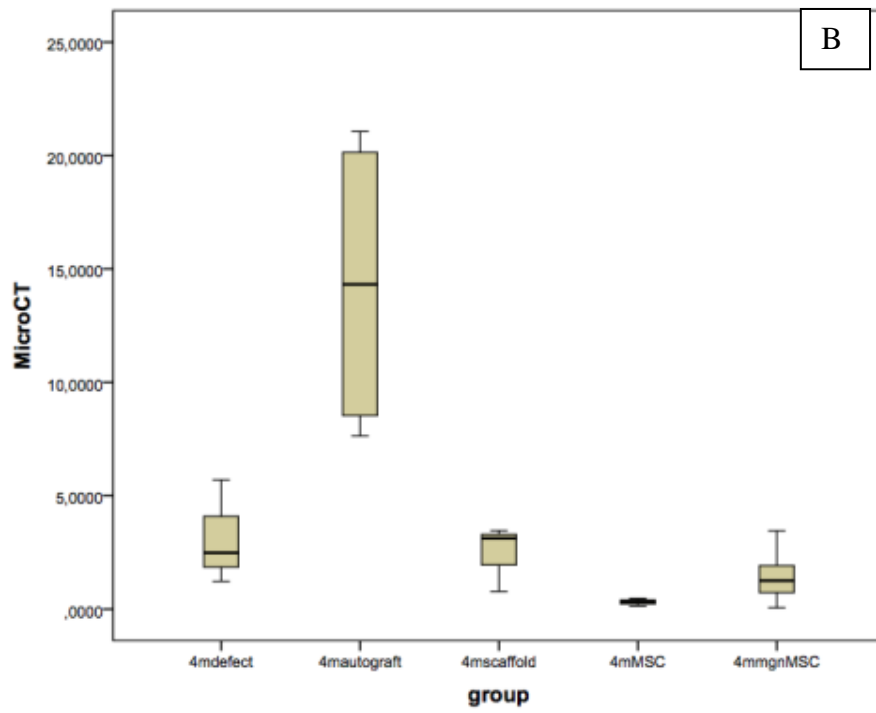
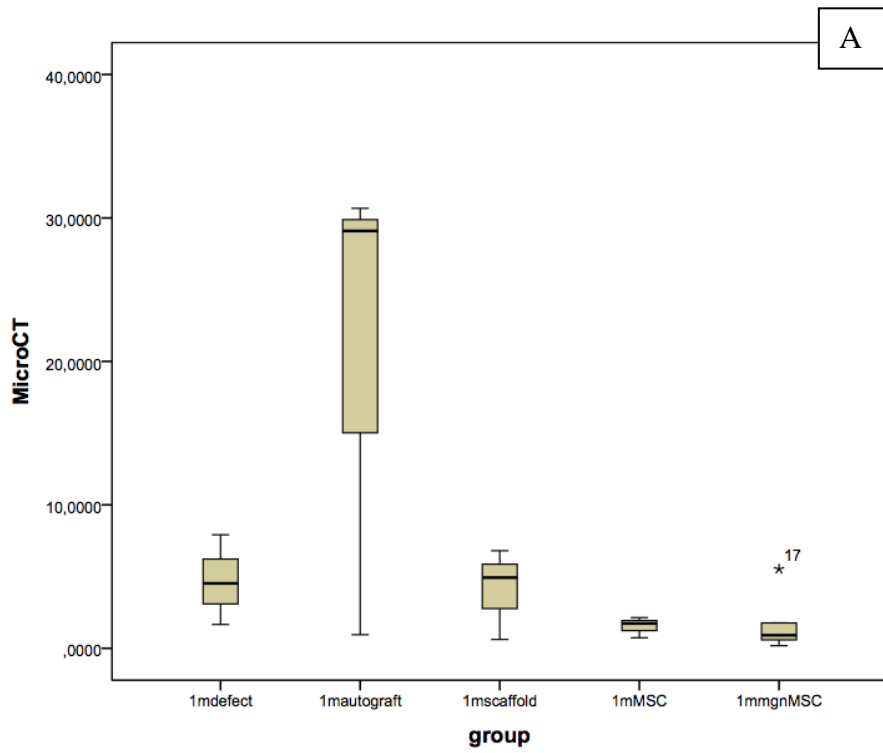
Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 4 aylık kalvariyal defekt alanına ait mikrograflardır. Otogreft, doku iskelesi-MKH ve doku iskelesi-BMP ile transfekte MKH uygulanan gruplarda kavitedeki osteoid ve yeni kemik miktarının kontrol ve boş doku iskelesi grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Doku iskelesi gruplarında biyomalzeme uygulanan alanlar takip sırasında eridiklerinden yerlerinde boşluklar kalmıştır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, I: Doku iskelesi, O: Osteoid, K1: Kıkırdak, Be: Beyin, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom

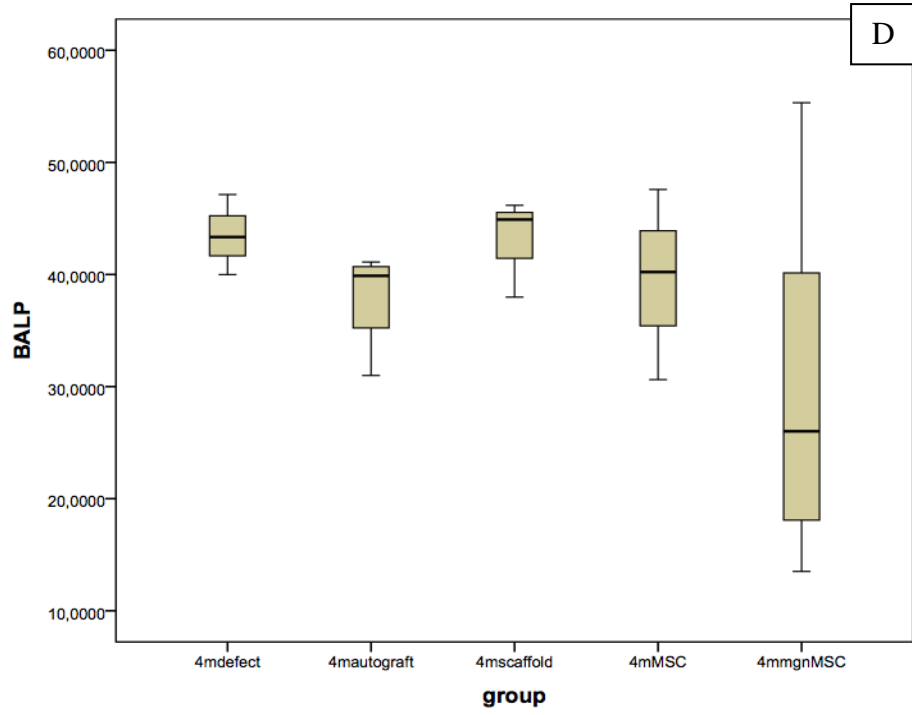
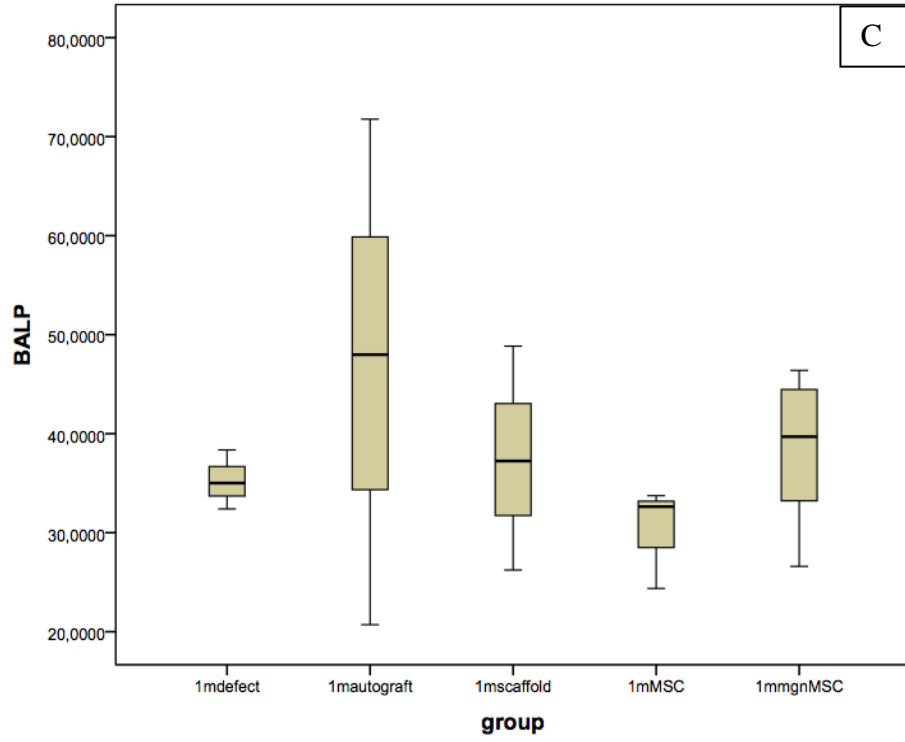




Şekil 4.1. 1. ay ve 4. ay İstatistiksel veriler

A ve B'de birinci ayda, C ve D'de dördüncü ayda deney ve kontrol gruplarında defekt alanındaki kemik oranı ve kemik alanına ait tanımsal istatistikler görülmektedir.





Şekil 4.2. Mikrotomografik kemik hacmi ve kan alkalin fosfataz değerleri

A,B,C,D: A ve B’de birinci ayda, C ve D’de dördüncü ayda deney ve kontrol gruplarında defekt alanındaki mikrotomografik kemik hacmi ve kan alkalin fosfataz değerlerine ait tanımsal istatistikler görülmektedir.

4.3. Gen Ekspresyon Bulguları

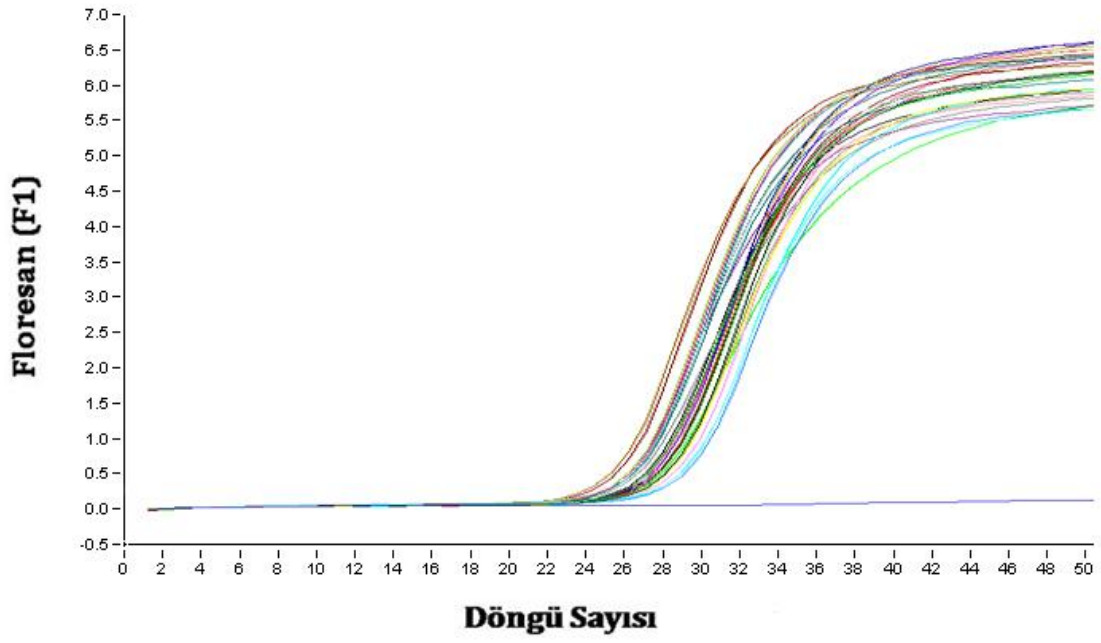
Bu çalışma kapsamında incelenen gruplardan bir tanesi BMP-2 transfekte edilmiş kemik stromal hücredir. Bu hücreler yukarıda da anlatıldığı üzere BMP-2 geni taşıyan bir plazmid ile transfekte edilmişlerdir. Böylece hücrelerin belirli bir süre kendi metabolizmalarındaki ek olarak ilave BMP-2 sentezlemesi sağlanmıştır.

Plazmid ile aktarılan genin hücrelerdeki ifadenme düzeyi, bu geni taşıyan plazmidin hücre içine girebilme etkinliği ile doğru orantılıdır. Başka bir deyişle, transfeksiyon verimi ne kadar yüksek ise ilgili genin ifadenmesi ve buna bağlı gen ifadenme ürününün ortamdaki konsantrasyonu yüksek olacaktır. Bu çalışmada kullanılan hBMP-2 geni içeren plazmidlerin primer hücrelere aktarım yüzdesi paralel çalışmalarda yaklaşık %15-20 oranında bulunmuştur. Bu transfeksiyon verimi her ne kadar düşük gibi görünse de primer hücreler ile yapılan benzer transfeksiyon çalışmaları ve literatür ile uyumludur [81,82].

4.4. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

Runx2, ALP, Col Type I ve OC genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanılmıştır. Rat Kemik Kalvaria dokularından elde edilen Runx2, ALP, Col Type I, OC ve bu genlerin ifadenmesini normalize etmek için ACTB (beta actin) genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak çalışılmıştır.

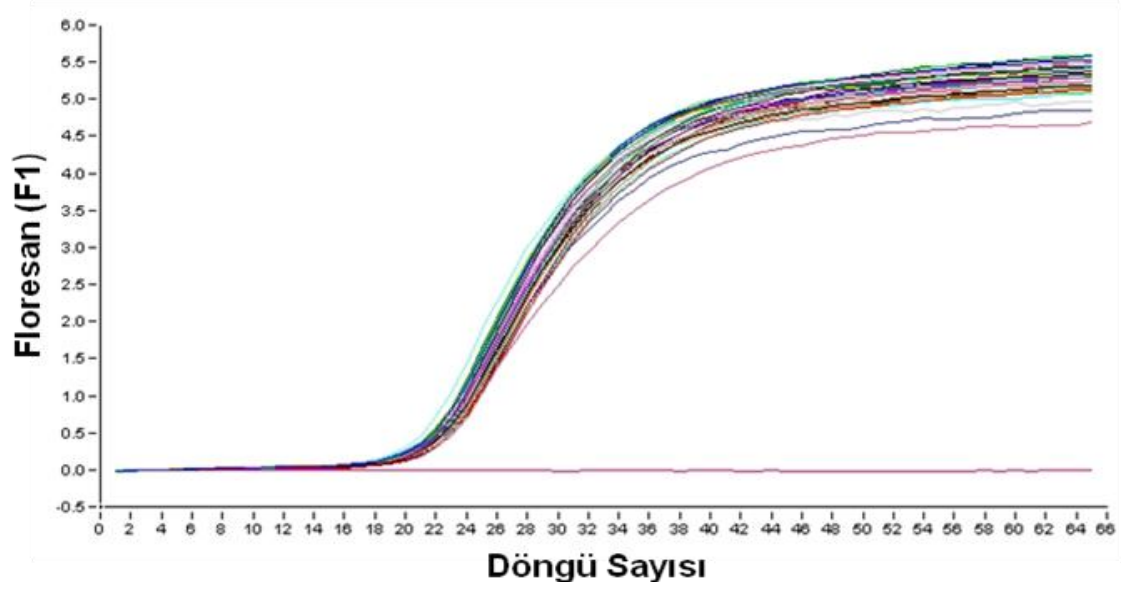
Gen ifadenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan ACTB geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3. ACTB geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.

ACTB geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresan sinyal izlenmektedir.

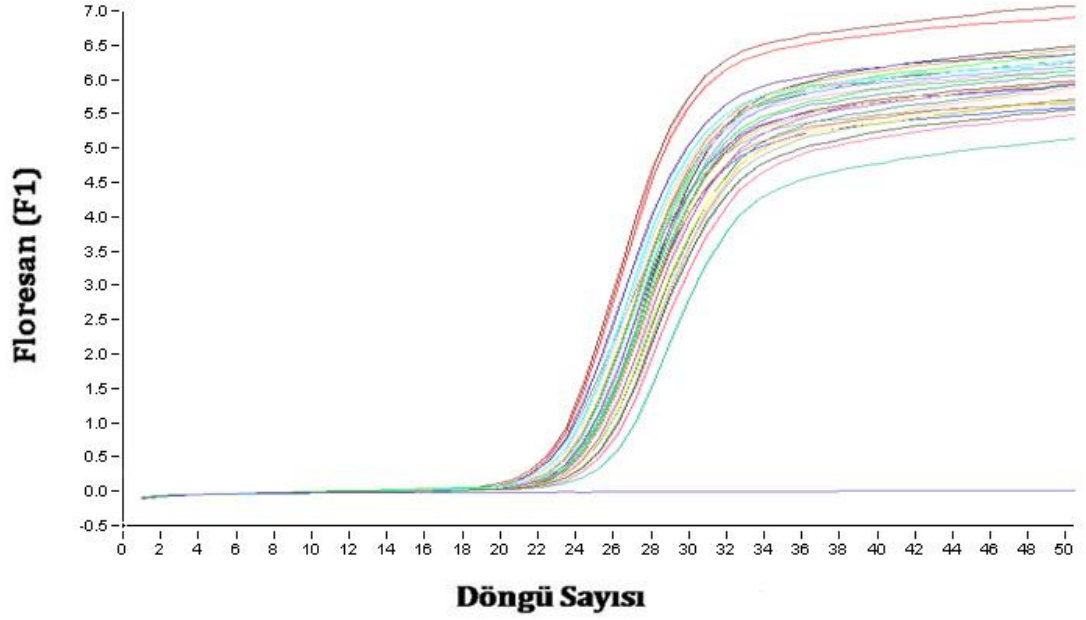
Runx2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Runx2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri

Runx2 geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

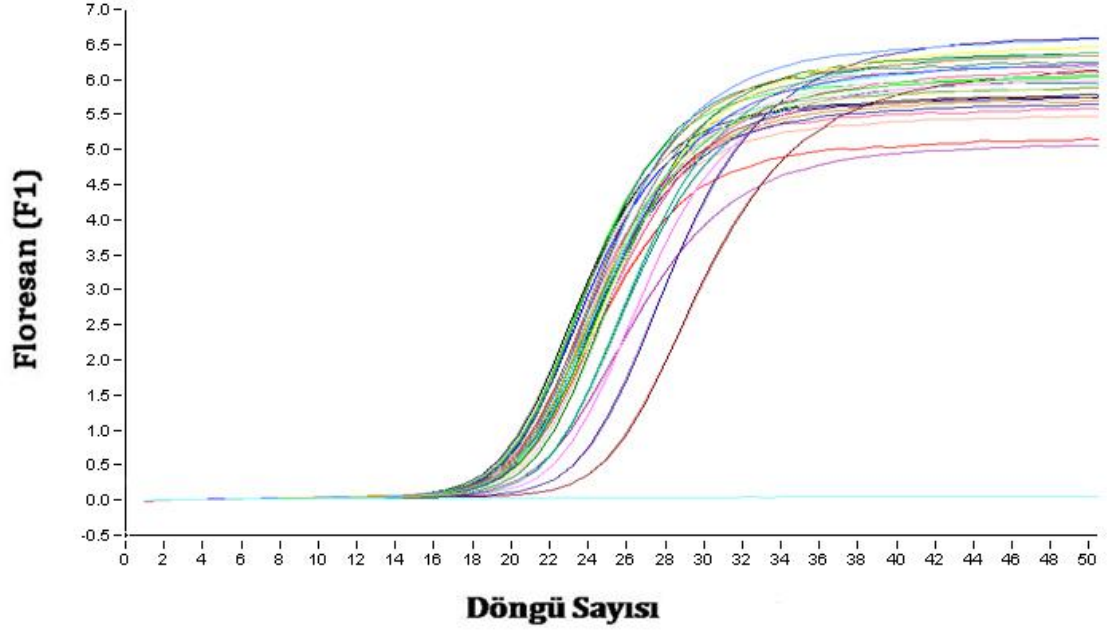
ALP geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. ALP geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri

ALP geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresans sinyal izlenmektedir.

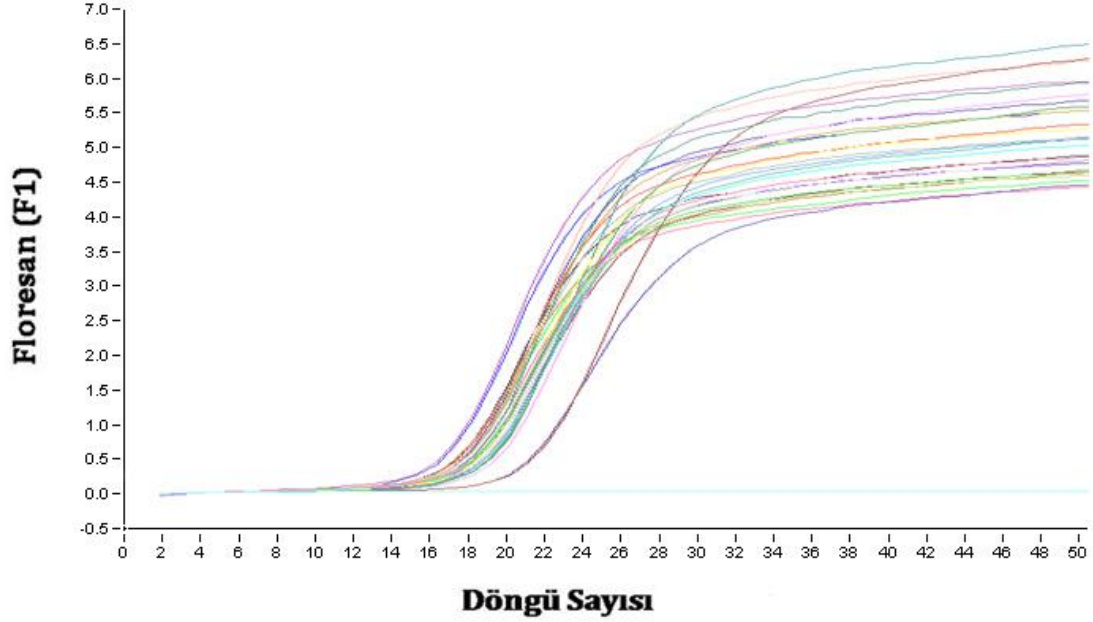
Coll1a1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Coll1a1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri

Coll1a1 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

OC geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. OC geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri

OC geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresans sinyal izlenmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

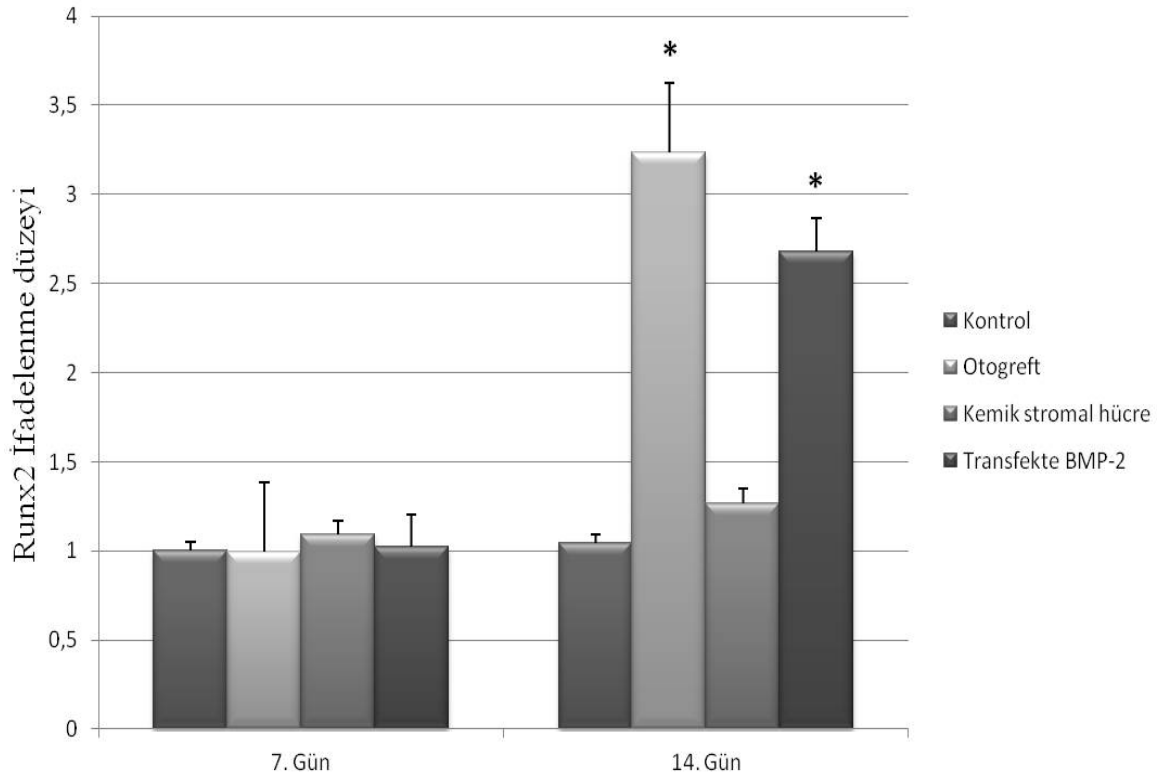
$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol- hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol- hasta})}}$$

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

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

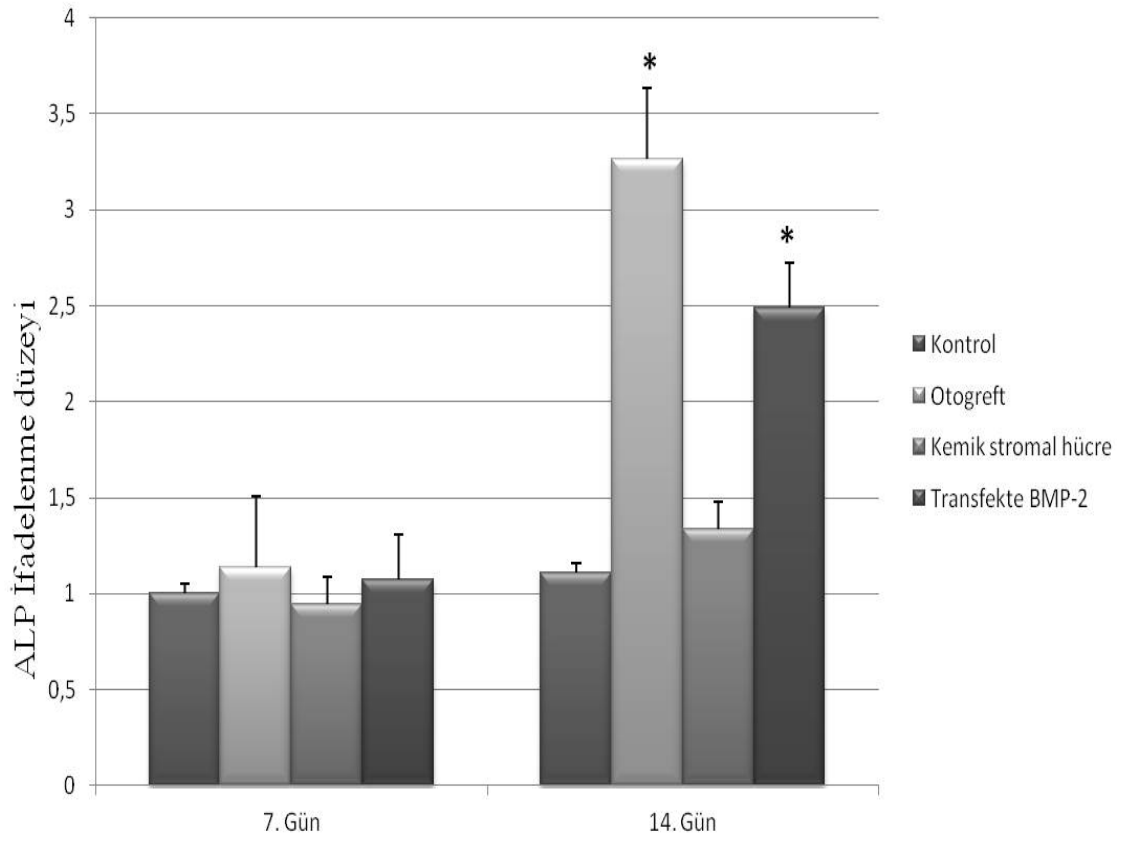
Gen İfade düzeylerinin karşılaştırılması için Real Time PCR analizi ile elde edilen sonuçlar QIAGEN-REST-2009 (Relative Expression Software Tool) programı kullanılmıştır. Real Time PCR’da bir genin ortamdaki konsantrasyonu ifadenme düzeyi ile doğru orantılıdır. Başka bir deyişle, bir gen ne kadar çok ifadeleniyorsa, sentezlenmesi o kadar yüksektir. Real Time PCR çalışma temeline göre yüksek konsantrasyondaki genler daha erken ışına yaparken düşük konsantrasyondaki genler geç ışına yaparlar. Bu çalışma kapsamında bu ifadenme düzeyleri karşılıklı olarak analiz edilerek, genler ve gruplar arasındaki bağıntı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Gen ifade düzeylerinin zamansal ve grupsal incelenmesi ile ortaya çıkan grafikler, Şekil 4.8 - 4.12’de verilmiştir. Bunun yanında bu ifadenme düzeyleri ile ilgili yapılan istatistik çalışmasına ait değerler Ek ‘te verilmiştir.



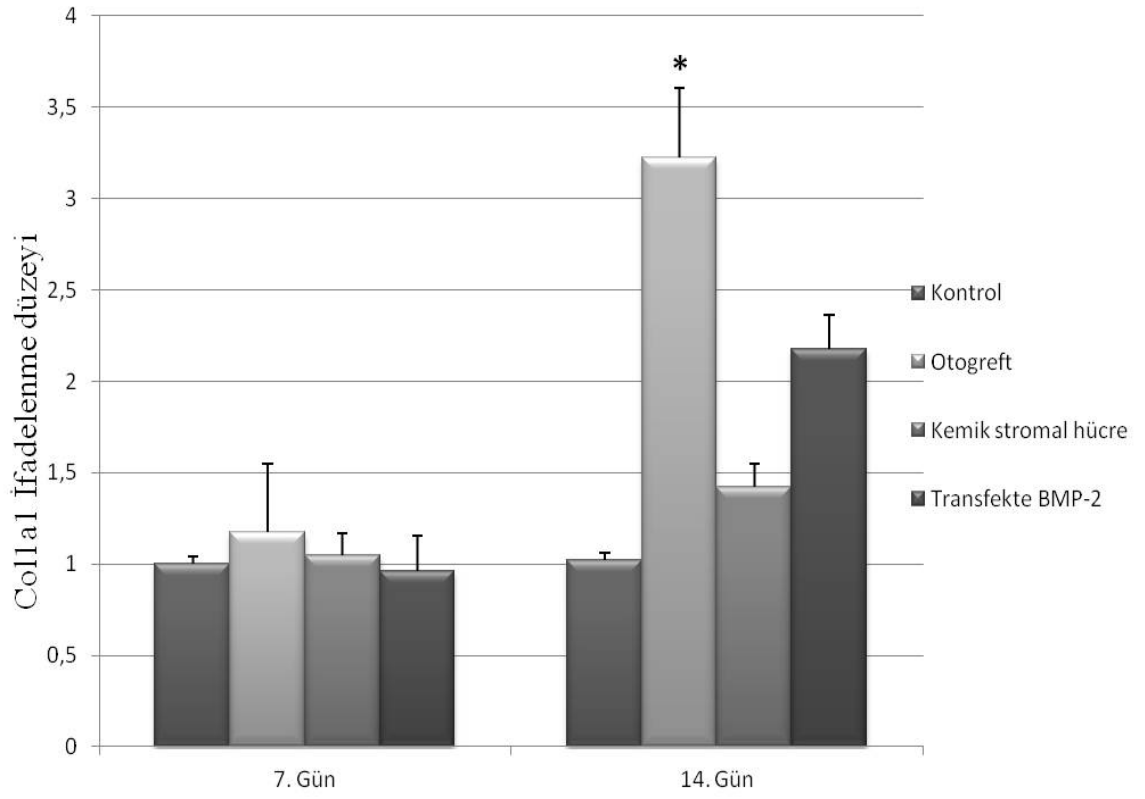
Şekil 4.8. Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki Runx2 geninin mRNA düzeyindeki değişiklik

Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *, p<0.05.



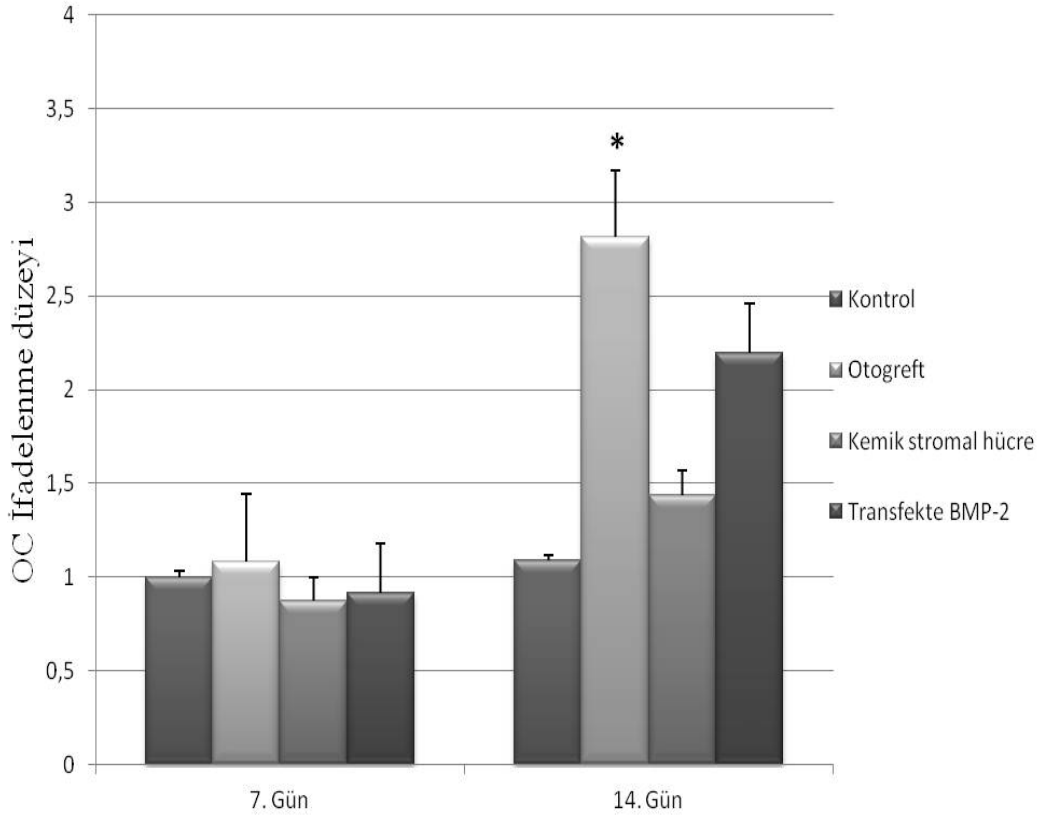
Şekil 4.9. Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki ALP geninin mRNA düzeyindeki değişiklik

Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; p<0.05.



Şekil 4.10. Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki Colla1 geninin mRNA düzeyindeki değişiklik

Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$.



Şekil 4.11. Rat kemik dokusu kalvaria defekt modeli uygulaması sonrasında 7. gün ve 14. gündeki OC geninin mRNA düzeyindeki değişiklik

Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. *; $p < 0.05$.

Tüm grafikler incelendiğinde gruplar arası erken dönem gen ifadelerinin karşılaştırılması konusunda şu görüşler ortaya konabilir.

Erken dönem gen ifadesinin karşılaştırılması için 7. ve 14. günde elde edilen sonuçlarda karşılaştırılan genler arasında RUNX2, erken dönem kemik oluşumu ve osteoblast farklılaşmasının bir belirteçidir. İskelet (Kemik) gelişiminin çok erken dönemlerinde aktive olarak iskelet gelişimi üzerinde düzenleyici etki gösterir. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarda 7. günde RUNX2 aktivitesine kontrole göre anlamlı olarak rastlanamamıştır.

Fakat 14. gündeki RUNX2 ile ilişkili mRNA düzeylerinde kontrole göre artış meydana gelmiştir. Bu artışlar Ototreft ve Transfekte BMP-2 hücreli grupta oldukça anlamlıdır. Kemik stromal hücre grubunda da 14.gün sonunda kontrole göre belirli bir ifadelene artış meydana gelse de; bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. RUNX2 geninin ifadesinin gelişimin ilerleyen günlerinde artış göstermesi literatür ile

uyumludur [83]. Bu düzenleyici Runx2" nin tekrar ifade edilmesi, kemik oluşumunda ALP, COL1 ve OC genlerinin ifade düzeylerini arttırması beklenir.

ALP (alkalen fosfataz); başlıca karaciğer, böbrek, kemik ve plasenta olmak üzere tüm insan dokularında bulunan fosfat hidrolaz enzimidir. Bu enzimin özgül etkinliği hücre ve dokuların aktifliği ile doğrudan ilişkilidir. Aynı zamanda ALP kemik onarımı aşamasında mineralizasyon evresinde kalsiyumun yapı içerisine çökmesinde etkindir. ALP geni tüm gruplarda 7. günde sonunda kontrole göre anlamlı bir ifadelenme göstermemiştir. 14. gün sonunda ise otogreft ki bu grupta aktif osteoblastların varlığı unutulmamalıdır; ve BMP2 transfekte hücreli grupta istatistiksel olarak anlamlı bir ifadelenme vardır. Bu elde edilen değerler Runx2" nin ifade düzeyleriyle de korelasyon göstermektedir.

Kemiğin organik matriksi erişkinlerde kemik ağırlığının %25" ini, hacim olarak da %38" ini oluşturur. Bu organik maddelerin %95" i kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşmaktadır.

Tip I kollajen(COL I) kemik matriksinde bulunan temel kollajendir. Deri, diş, kornea, damarlar ve tendonlar gibi birçok kemik hücre tipinde baskındır. Bu protein hücre adezyonunda osteoblastların proliferasyonunda ve fenotiplerinin farklılaşmasında görev alır. Kollajen Tip I osteoblastik farklılaşmada erken belirteç olarak görev aldığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda 14.gün Otogreft ve BMP2 transfekte hücreli grupta kontrole göre belirgin bir COL I ifadelenmesine ulaşılmıştır. COL I her ne kadar kemiğe özgü bir belirteç olmasa da dokulardaki yüksek ifadelemesi kemik matriks oluşumu ile orantılıdır.

Erken dönem gen ifadesi çalışmalarında diğer bir gen olarak Osteokalsin (OC) seçilmiştir. Osteokalsin bir kemik gla proteindir. Kemikteki hidroksiapatit bağlama yeteneğindedir. Belirli kemik hücreleri tarafından (osteoblastlar ve odontoblastlar) kemik sentezlenir ve kemiğin biçimlenmesinde ve matriks sentezi ve matriks mineralizasyonu aşamalarında büyük rol oynarlar. Gen ifadesinin düzenlenmesi RUNX2 ile ilişkilidir. Elde edilen sonuçlar ışığında daha geç dönemde ifade edilen genlerden OC ifade düzeylerinde 7.günde bir farklılık gözlenmemiştir. Kemiğe özgü bir protein olan OC geninin ifade düzeyleri 14. günde otogreft grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yüksektir. BMP-2 transfekte hücreli grupta

ve normal kemik stromal hücre grubunda da OC gen ifadesi kontrole göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlılık kazanamamıştır.

Erken dönem gen ifadesi çalışması sonuçları ışığında otogreft grubunda incelenen genler bakımından iyi bir kemik hücre gelişimi ve matriks sentezi beklenmelidir. Bunun yanında BMP-2 transfekte grup'ta kemik hücresi gelişi ve matriks sentezi de altın standart olan otogreft grubu ile rekabet edebilecek sonuçlara sahiptir.

4.6. Real Time PCR Gen İfadelenme Analizi İstatistik Değerleri

Tablo 4.1. Rat kemik dokusunda 7. ve 14. günlerdeki kontrol ile otogreft grubu arasındaki Runx2, ALP, Colla1 ve OC gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	7. Gün		14. Gün	
	İfadelenme	P değeri	İfadelenme	P değeri
ACTB	1,000	1,000	1,000	1,000
Runx2	0,994	0,868	3,234	0,0001
ALP	1,14	0,901	3,263	0,0001
Colla1	1,174	0,952	3,227	0,0001
OC	1,085	0,883	2,812	0,0001

Tablo 4.2. Rat kemik dokusunda 7. ve 14. günlerdeki kontrol ile kemik stromal hücre grubu arasındaki Runx2, ALP, Colla1 ve OC gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	7. Gün		14. Gün	
	İfadelenme	P değeri	İfadelenme	P değeri
ACTB	1,000	1,000	1,000	1,000
Runx2	1,09	0,906	1,269	0,528
ALP	0,943	0,748	1,334	0,274
Colla1	1,045	0,94	1,424	0,382
OC	0,871	0,643	1,439	0,326

Tablo 4.3. Rat kemik dokusunda 7. ve 14. günlerdeki kontrol ile transfekte BMP-2 grubu arasındaki Runx2, ALP, Col1a1 ve OC gen ifade düzeylerine ilişkin istatistiksel analizi

Gen	7. Gün		14. Gün	
	İfadenme	P değeri	İfadenme	P değeri
ACTB	1,000	1,000	1,000	1,000
Runx2	1,021	0,897	2,681	0,035
ALP	1,074	0,901	2,49	0,027
Col1a1	0,964	1,000	2,174	0,074
OC	0,917	0,862	2,197	0,089

5. SONUÇ

Çalışma süresince tüm gruplardaki ratlarda uygun anestezi ve cerrahi işlem altında deney protokolü tamamlanmıştır. Çalışma süresince anesteziye bağlı veya postoperatif bakım esnasında denek kaybı gözlenmemiştir. Yapılan çalışmada deneklerin hiçbirinde yara yeri enfeksiyonu, fistül, greft enfeksiyonu gözlenmemiştir.

Birinci ay sonuçlarında deney gruplarında kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı derecede olumlu yeni kemikleşme oranı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Mikrotomografi ve kan ALP değerleri bu dönemde gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). BMP ile transfekte MKH uygulanan gruptaki yeni oluşan kemik alanı ve total defekte oranı, defektin boş bırakıldığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı ($p<0.05$). otogreft grubundaki yeni kemik alanı ve bu alanın total defekt alanına oranı boş bırakılan defekt grubuna göre anlamlı biçimde fazlaydı ($p<0.05$). Bu dönemde BMP ile transfekte hücre uygulanan grupla otogreft grubu karşılaştırıldığında ise yeni kemik alanı ve oranı otogreft grubunda daha fazlaydı ($p<0.05$).

Dördüncü ay sonuçlarına bakıldığında kemikleşme oranı açısından otogreft grubu anlamlı derecede yeni kemikleşme göstermiştir ($p<0.05$). BMP-2 transfekte edilen grup otogreft kadar kemikleşme oranı göstermese de diğer gruplar içerisinde en fazla yeni kemik oluşumu bu grupta saptanmıştır.

Çalışmanın sonuçlarına göre yeni kemikleşme oranı ve ALP değerleri arasında bir korelasyon görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Doku iskelesi (skafold) uygulanan gruplarda biyomalzemeye hafif ila orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte nekroza rastlanmamıştır.

Gen ekspresyonu açısından incelendiğinde, bu çalışmada kullanılan hBMP-2 geni içeren plazmidlerin primer hücrelere aktarım yüzdesi paralel çalışmalarda yaklaşık %15-20 oranında bulunmuştur. Bu transfeksiyon verimi her ne kadar düşük gibi görünse de primer hücreler ile yapılan benzer transfeksiyon çalışmaları ve literatür ile uyumludur.

Kemiğe özgü bir protein olan OC geninin ifade düzeyleri 14. günde otogreft grubunda kontrole göre anlamlı şekilde yüksektir. BMP-2 transfekte hücreli grupta ve normal kemik stromal hücre grubunda da OC gen ifadesi kontrole göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlılık kazanamamıştır ($p>0.05$).

Yapılan çalışmalarda 14.gün Otogreft ve BMP2 transfekte hücreli grupta kontrole göre belirgin bir COL I ifadelenmesine ulaşılmıştır.

ALP geni tüm gruplarda 7. günde sonunda kontrole göre anlamlı bir ifadelenme göstermemiştir. 14. gün sonunda ise otogreft ki bu grupta aktif osteoblastların varlığı unutulmamalıdır ve BMP2 transfekte hücreli grupta istatistiksel olarak anlamlı bir ifadelenme vardır ($p<0.05$). Bu elde edilen değerler Runx2" nin ifade düzeyleriyle de korelasyon göstermektedir.

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarda 7. günde RUNX2 aktivitesine kontrole göre anlamlı olarak rastlanamamıştır ($p>0.05$). Fakat 14. gündeki RUNX2 ile ilişkili mRNA düzeylerinde kontrole göre artış meydana gelmiştir. Bu artışlar Otogreft ve Transfekte BMP-2 hücreli grupta oldukça anlamlıdır. Kemik stromal hücre grubunda da 14.gün sonunda kontrole göre belirli bir ifadelenme artışı meydana gelse de; bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Kalvaryal kemik defektlerinin onarımında BMP-2 transfeksiyonu yapılmış scaffoldun kullanımı altın standart olan otogreft kullanımına yakın histolojik ve radyolojik bulgular göstermiştir. Doku mühendisliğindeki gelişmeler ışığında BMP-2'nin yeni kemik oluşumu üzerine olan etkilerini ortaya koymak için kapsamlı araştırmalar ihtiyaç duyulmaktadır.

6. TARTIŞMA

Günümüzde her ne kadar kranial defektlerin onarılması için belirli prensipler ortaya konmuşsa da, kullanılacak materyal ve teknik konusunda, henüz belirli bir protokol sağlanamamıştır [9-11]. Günümüzde otogreft ile kemik defektinin tedavi edilmesi, bu sorunun giderilmesi için altın standart olarak kabul edilir, fakat her greftleme yönteminde olduğu gibi otogreft yönteminde de belirli riskler vardır. Bu yüzden son yıllarda doku mühendisliğinin insan vücuduna biyolojik olarak uyumlu çeşitli yapay iskeleler kurması nedeni ile günümüzde otojen kaynakların yerine artık bu materyallerin kullanılması ve tedavide yeni stratejilerin gelişmesi gündeme gelmiştir [13, 14].

BMP-2 yaralanan kemik kaynaklı morfogenez proteindir. Mitojenik ve dönüştürücü bir faktördür. Mezenşimal hücrelerin kırık ve kemik hücrelerine farklılaşmasına, ektojik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür [10, 15]. Yapılan çalışmalarda BMP-2 'nin kemik defekti onarımında yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. BMP-2 nin *in vivo* ortamda hızla çözündüğü bilinmektedir transfeksiyon ile ortamda kalma süresi uzatılırsa etkisi de daha fazla olmaktadır [60, 61]. Bizde çalışmamızda transfeksiyonun ortamdaki BMP-2 konsantrasyonunu arttıran özelliğinden faydalanmak istedik. Elde ettiğimiz histolojik ve gen ekspresyonu analizleri bu amacımızı destekledi.

Gen ekspresyon çalışmasının 14. Günündeki yüksek gen ifadenme düzeyleri de BMP-2 nin membranöz kemik iyileşmesinde ilk 2 haftada yüksek düzeyde olması ile bağlantılı olduğu kanıtlar nitelikteydi.

BMP-2 nin kök hücre göçüne sebep olduğu bilindiğinden [62, 63] çalışmada kök hücre grubunun dahil edilmesi karşılaştırmalı analiz için anlamlı olduğu düşünüldü ancak mezenşimal kök hücre grubu ile istatistiksel olarak anlamlı kemik iyileşmesi görülse de tatminkar değildi.

Bizim çalışmamıza benzer olarak, Zhao, J ve arkadaşları kalvaryal defektlerin onarımında BMP-2 yüklenmiş kitosan skafoldlar kullanmışlar ve *in vivo* olarak yeni kemik oluşumunun hızlandığını bildirmişlerdir [64].

Bizim çalışmamızda kullandığımız transfeksiyon verimi %15 – 20 civarında olduğu gözlenmiş literatürdeki viral transfeksiyon verimliliği göze alındığında düşük

olduğu düşünülse de, viral kökenli transfeksiyonun konak üzerinde uzun dönemde sekonder komplikasyon gelişmesi riski taşıdığı göz ardı edilmemelidir.

Bir başka çalışmada kritik boyuttaki kranial defektlerin onarımında doku mühendisliği kullanılarak kemik iliği kaynaklı kök hücreler kullanılmış, histolojik ve biyokimyasal olarak yeni kemik gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [65].

Notodihardjo ve arkadaşları yaptıkları deneysel bir çalışmada rat kalvaryal defekti onarımında BMP-2 nin kemik yapımına olan etkisini incelemişler ve sonuçta yeni kemik oluşumu üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir [66].

Tan R. Ve arkadaşları kritik büyüklükteki kalvaryal defektlerin onarımında kontrollü biçimde BMP-2 salınımının kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir [67].

Vinci ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kalvaryal defekti olan on bireyin otogreft ile kapatılmasından sonra histolojik ve mikrotomografi ile değerlendirme yapmışlardır. Literatür ile uyumlu olarak altın standart olan otogreft kullanımının kemik oluşumu ve onarımı üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir [68].

Doku mühendisliği; temel olarak yapay bazı malzemeler ve hücrelerden yararlanarak, hasar görmüş dokunun yerine yenisini oluşturmayı amaçlar[69-71]. Bu anlamda: yapay ağlar (matriksler), in vitro koşullarda elde edilen hücreler ve sistemik veya yerel düzenleyici farmakolojik ajanlar bu alanın esas bileşenleridir.

Kim, J. Ve arkadaşları tavşan kalvaryal defekti modelinde tirozin derivativesi polikarbonat tabanlı scaffoldlar kullanmış ve BMP-2 yükleyerek etkilerini araştırdıklarında, spontan iyileşmeye oranla biyolojik madde olsun veya olmasın kullanılacak sentetik doku iskelelerinin kritik büyüklükteki kalvaryal defektlerin onarımında kullanılmasının olumlu olduğunu bildirmişlerdir [72].

Terella A ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada kalvaryal defektlerin onarımında polietilen glikol tabanlı bir scaffold kullanmışlar ve proteolitik özelliğinden dolayı bu yeni scaffoldun kemik onarımında ümit vaat ettiğini bildirmişlerdir.[73].

Jiang, Z e arkadaşları kemik iliği hücrelerini taşımak amacı ile plateletten zengin plazmayı scaffold olarak kalvaryal kemik defekti onarımında kullanmışlardır.

Sonuçta kullanılan scaffoldun kalvaryal defektin iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğunu fakat kemik iliği hücrelerini taşımada sınırlı olduğunu bildirmişlerdir [74].

Doku mühendisliği alanında son yıllarda yapılan çalışmalarda, kök hücreler ve kemik iliği stromal hücreleri önem kazanmıştır [14]. Yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip bu hücreler, embriyonik kök hücreler ya da erişkinden elde edilmiş kök hücreler olabilir.

Zou D ve arkadaşları deneysel olarak kalvaryal defekt onarımında kemik iliği hücrelerinin önemini araştırdıkları çalışmalarında, kemik iliği hücrelerinin anlamlı derecede yeni kemik oluşumunu defekt alanında vaskülarizasyonu arttırdığını ve kemiğin mineral dansitesine olumlu katkıları olduğunu göstermişlerdir[17, 75].

Yine literatür incelendiğinde otolog kemik iliği kök hücrelerinin kalvaryal defekt onarımında olumlu etkileri olduğunu gösteren bir çok deneysel araştırma mevcuttur [76-78].

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında literatür ile uyumlu olarak birinci ayda kalvaryal defektlerdeki yeni kemikleşme oranı histolojik olarak en fazla otograft grubunda gerçekleşmiştir[69, 79]. Doku uyumluluğu açısından bu beklenen bir sonuçtur. Fakat Mikrotomografi ve kan ALP değerleri bu dönemde gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Mikrotomografi ve ALP'ın değişmemesi, ilk ayda kritik boyuttaki defektin kemikleşmenin erken evresinde olması nedeniyle adı geçen ölçümlerin anlamlı değerlere ulaşamadığı biçiminde yorumlanabilir.

Dördüncü ay sonuçlarına bakıldığında BMP ile transfekte edilmiş MKH'ler histolojik ve tomografik olarak kalvariyal defektte iyileşme sağlasa da, altın standart olan otograft uygulamasının diğer gruplara göre daha ileri kemikleşme sağladığı sonucuna varıldı.

Çalışmanın sonuçlarına göre yeni kemikleşme oranı ve ALP değerleri arasında bir korelasyon görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Kritik büyüklükteki kalvaryal defekterin onarılması esnasında doku iyileşmesini hızlandırmak ve defektin daha çabuk kapanmasını sağlamak için greft kullanılması uygun bir seçenektir [1, 9, 80]. Doku mühendisliğindeki pek çok gelişme sayesinde otograftın kullanılamayacağı durumlarda, organizmaya en az yabancı karakterde çeşitli biyomalzemeler yüklü taşıyıcılar deneysel olarak

araştırılmaktadır [35]. Çalışmamızda kemik stromal hücreleri ve BMP-2 kullanılmıştır. BMP-2 nin kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu histolojik ve radyolojik olarak gösterilmiştir. Kalvaryal defekt hasralarında BMP-2 tranfekte edilmiş kemik stromal hücre doku iskelesinin etkilerini ayrıntılı olarak ortaya konması için klinik ve deneysel başka çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Fournier, H.D., et al., Surgical anatomy of calvarial skin and bones--with particular reference to neurosurgical approaches. *Adv Tech Stand Neurosurg*, 2006. 31: p. 253-71.
2. Tubbs, R.S., A.N. Bosmia, and A.A. Cohen-Gadol, The human calvaria: a review of embryology, anatomy, pathology, and molecular development. *Childs Nerv Syst*, 2012. 28(1): p. 23-31.
3. Agrawal, A. and L.N. Garg, Split calvarial bone graft for the reconstruction of skull defects. *J Surg Tech Case Rep*, 2011. 3(1): p. 13-6.
4. Sullivan, W.G. and A.A. Smith, The split calvarial graft donor site in the elderly: a study in cadavers. *Plast Reconstr Surg*, 1989. 84(1): p. 29-31.
5. Abuzayed, B., Comment on article 'split calvarial bone graft for the reconstruction of skull defects'. *J Surg Tech Case Rep*, 2011. 3(1): p. 7.
6. G.H, P., *Anatomy of the head and neck*. 1973, Philadelphia: WB. Saunders. 77.
7. Sirola, K., Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study. *Ann Med Exp Biol Fenn*, 1960. 38(Suppl 2): p. 1-87.
8. Prolo DJ., G.R., DeVine JS., Oklund SA., Clinical utility of allogeneal skull discs. in human craniotomy. *Neurosurgery* 1984. 14(183).
9. Nakagaki, W.R. and J.A. Camilli, Spontaneous Healing Capacity of Calvarial Bone Defects in mdx Mice. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012.
10. Garrison, K.R., et al., Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(6): p. CD006950.
11. Otto, W.R. and J. Rao, Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*, 2004. 37(1): p. 97-110.
12. Tubbs, R.S. and A. Cohen-Gadol, The human calvaria. *Childs Nerv Syst*, 2012.
13. Derubeis, A.R. and R. Cancedda, Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*, 2004. 32(1): p. 160-5.

14. Taub, P.J., et al., Bioengineering of calvaria with adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*, 2009. 123(4): p. 1178-85.
15. Herford, A.S., rhBMP-2 as an option for reconstructing mandibular continuity defects. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009. 67(12): p. 2679-84.
16. Issa, J.P., et al., Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis of rat mandibles. *Clin Oral Implants Res*, 2009. 20(11): p. 1286-92.
17. Zou, D., et al., Repair of critical-sized rat calvarial defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Stem Cells*, 2011. 29(9): p. 1380-90.
18. Junqueira LC, C.J., *Basic Histology*. 10th ed ed. 2003, New York: McGraw-Hill. 144-146.
19. Bancroft JD, S.A., *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4 ed. 1996, New York: Churchill Livingstone.
20. Wilkins, B.S., Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. I. *J Clin Pathol*, 1992. 45(8): p. 645-9.
21. Travlos, G.S., Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*, 2006. 34(5): p. 548-65.
22. Ochsner, P.E. and S. Hailemariam, Histology of osteosynthesis associated bone infection. *Injury*, 2006. 37 Suppl 2: p. S49-58.
23. Barthel, H.R. and M.J. Seibel, [Role of bone histology in the determination of bone metabolism]. *Med Klin (Munich)*, 2003. 98(2): p. 111-2; author reply 113.
24. Schaefer, H.E., [Cytology and histology of normal human bone marrow]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1983. 67: p. 80-100.
25. Mavcic, B. and V. Antolic, Optimal mechanical environment of the healing bone fracture/osteotomy. *Int Orthop*, 2012.
26. Tarantino, U., et al., Bone healing and osteoporosis. *Aging Clin Exp Res*, 2011. 23(2 Suppl): p. 62-4.
27. Schenk, R.K., [Histology of primary bone healing]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, 1975. 19: p. 8-12.

28. Brond AR, R.T., Fracture Healing. Surgery of the Musculoskeletal System. 2 ed. 1990, New York: Churchill Livingstone.
29. Greenwald, A.S., et al., Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. J Bone Joint Surg Am, 2001. 83-A Suppl 2 Pt 2: p. 98-103.
30. Moore, W.R., S.E. Graves, and G.I. Bain, Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg, 2001. 71(6): p. 354-61.
31. Parikh, S.N., Bone graft substitutes: past, present, future. J Postgrad Med, 2002. 48(2): p. 142-8.
32. Tancred, D.C., A.J. Carr, and B.A. McCormack, Development of a new synthetic bone graft. J Mater Sci Mater Med, 1998. 9(12): p. 819-23.
33. Aykın Simsek, G.Ç., Erdal Cila, Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği 2004. 3(3-4).
34. Costantino, P.D. and C.D. Friedman, Synthetic bone graft substitutes. Otolaryngol Clin North Am, 1994. 27(5): p. 1037-74.
35. Betz, R.R., Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. Orthopedics, 2002. 25(5 Suppl): p. s561-70.
36. Parikh, S.N., Bone graft substitutes in modern orthopedics. Orthopedics, 2002. 25(11): p. 1301-9; quiz 1310-1.
37. Vaccaro, A.R., The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics, 2002. 25(5 Suppl): p. s571-8.
38. Viggesswarapu, M., et al., Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo. J Bone Joint Surg Am, 2001. 83-A(3): p. 364-76.
39. Vaccaro, A.R., et al., Bone grafting alternatives in spinal surgery. Spine J, 2002. 2(3): p. 206-15.
40. Bongso, A., Lee, E. H, Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources, Stem Cells from Bench to Bedside. 2005, Singapur: World Scientific Publishing Co.
41. Sanchez-Ramos, J., et al., Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol, 2000. 164(2): p. 247-56.

42. Ferrari, G., et al., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998. 279(5356): p. 1528-30.
43. Ulukradag, G., Tavşan Kalvaryumunda mezenşimal kök hücre transplantasyonu ile yönlendirilmiş kemik ogmentasyonunda elde edilen yeni kemiğin histolojik olarak değerlendirilmesi, in *Agız Dis Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Doktora Programı*. 2007, Gülhane Askeri Tıp Akademisi: Ankara.
44. Wozney, J.M., Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002. 27(16 Suppl 1): p. S2-8.
45. Van de Putte, K.A. and M.R. Urist, Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res*, 1965. 43: p. 257-70.
46. Urist, M.R., Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965. 150(3698): p. 893-9.
47. Sun, J., et al., [Effect of BMP-2 on osteogenesis of bone mesenchymal stem cells in rats]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 2011. 20(4): p. 352-7.
48. Song, I., et al., Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 408(1): p. 126-31.
49. Kim, S., et al., Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. *Acta Biomater*, 2012.
50. Notodihardjo, F.Z., et al., Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Craniomaxillofac Surg*, 2011.
51. Wildemann, B., et al., Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury*, 2011. 42(8): p. 746-52.
52. Luvizuto, E.R., et al., The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*, 2011. 32(15): p. 3855-61.
53. Behr, B., et al., A comparative analysis of the osteogenic effects of BMP-2, FGF-2 and VEGFA in a calvarial defect model. *Tissue Eng Part A*, 2011.
54. Zhang, S., et al., Polyethylenimine-PEG coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery. *Biomaterials*, 2010. 31(5): p. 952-63.

55. Kinsella, C.R., Jr., et al., BMP-2-mediated regeneration of large-scale cranial defects in the canine: an examination of different carriers. *Plast Reconstr Surg*, 2011. 127(5): p. 1865-73.
56. Kim, S., et al., In vitro evaluation of an injectable chitosan gel for sustained local delivery of BMP-2 for osteoblastic differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011. 99(2): p. 380-90.
57. Spector, J.A., et al., Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg*, 2001. 107(1): p. 124-34.
58. Zong, C., et al., Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*, 2010. 20: p. 109-20.
59. Mokbel, N., et al., Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*, 2008. 12(2): p. 73-8.
60. DeCesare, G.E., et al., Novel animal model of calvarial defect in an infected unfavorable wound: reconstruction with rhBMP-2. *Plast Reconstr Surg*, 2011. 127(2): p. 588-94.
61. Sawyer, A.A., et al., The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*, 2009. 30(13): p. 2479-88.
62. Michel, M., et al., Local BMP receptor activation at adherens junctions in the *Drosophila* germline stem cell niche. *Nat Commun*, 2011. 2: p. 415.
63. Park, K.H., et al., Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng*, 2009. 108(6): p. 530-7.
64. Zhao, J., et al., Enhanced healing of rat calvarial defects with sulfated chitosan-coated calcium-deficient hydroxyapatite/bone morphogenetic protein 2 scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 2012. 18(1-2): p. 185-97.
65. Xu, L., et al., The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB, BMSCs, and beta-TCP scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 2012.
66. Notodihardjo, F.Z., et al., Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Craniomaxillofac Surg*, 2012. 40(3): p. 287-91.

67. Tan, R., et al., Repair of rat calvarial bone defects by controlled release of rhBMP-2 from an injectable bone regeneration composite. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011.
68. Vinci, R., et al., Microcomputed and histologic evaluation of calvarial bone grafts: a pilot study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2011. 31(4): p. e29-36.
69. Sahoo, N., et al., Comparative evaluation of autogenous calvarial bone graft and alloplastic materials for secondary reconstruction of cranial defects. *J Craniofac Surg*, 2010. 21(1): p. 79-82.
70. Chen, G., et al., [Role of recombinant human bone morphogenetic protein 2/collagen as an onlay bone graft on adult rat calvarial bone]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2002. 16(2): p. 89-92.
71. Finkelman, R.D., et al., Elevated IGF-II and TGF-beta concentrations in human calvarial bone: potential mechanism for increased graft survival and resistance to osteoporosis. *Plast Reconstr Surg*, 1994. 93(4): p. 732-8.
72. Kim, J., et al., Bone Regeneration in a Rabbit Critical-Sized Calvarial Model Using Tyrosine-Derived Polycarbonate Scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 2012.
73. Terella, A., et al., Repair of a calvarial defect with biofactor and stem cell-embedded polyethylene glycol scaffold. *Arch Facial Plast Surg*, 2010. 12(3): p. 166-71.
74. Jiang, Z.Q., et al., Repair of calvarial defects in rabbits with platelet-rich plasma as the scaffold for carrying bone marrow stromal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011.
75. Zou, D., et al., Repairing critical-sized calvarial defects with BMSCs modified by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor-1alpha and a phosphate cement scaffold. *Biomaterials*, 2011. 32(36): p. 9707-18.
76. Shirasu, N., et al., Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochem*, 2010. 112(3): p. 270-7.
77. Ma, D., et al., Reconstruction of rabbit critical-size calvarial defects using autologous bone marrow stromal cell sheets. *Ann Plast Surg*, 2010. 65(2): p. 259-65.

78. Chen, M., et al., Effect of bone marrow mesenchymal stem cells transfected with rAAV2-bFGF on early angiogenesis of calvarial defects in rats. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010. 30(4): p. 519-24.
79. Park, J.W., et al., Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. Clin Oral Implants Res, 2009. 20(4): p. 372-8.
80. Greene, A.K., et al., Pediatric cranioplasty using particulate calvarial bone graft. Plast Reconstr Surg, 2008. 122(2): p. 563-71.
81. Odabas S., Kıkırdak Doku Oluşumundan Yeni Doku Mühendisliği Stratejilerinin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ABD. Doktora Tezi, 2011.
82. Hamm A., et al., Efficient Transfection Method for Primary Cells, Tissue Engineering, 2002, 8: 235.
83. Alıcı A., Hayvan Modellerinde “TGF- β 3” ve “BMP-2” Salan Doku İskeleleri ile Damak Yarığı Onarımı, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ABD. Yüksek Lisans Tezi, 2011.