

Kemik Doku Mühendisliği

*Uzm. Dr. Pınar YILGÖR HURİ**
*Prof. Dr. Nesrin HASIRCI***
*Prof. Dr. Vasıf HASIRCI****

Giriş

Organ ve dokuların hastalara nakledilmek üzere laboratuvar koşullarında oluşturulmasıyla uğraşan bir bilim dalı olan doku mühendisliği, canlı hücreler ve biyoyumlu ve biyobozunur polimerik doku desteklerinden canlı doku ve organların tasarım ve yapımını konu alan bir mühendislik dalıdır¹. Doku mühendisliği yöntemi genel olarak hücre tutunması ve işlevselliğini koruyup destekleyen bir doku desteği, hedef dokuya uygun olarak seçilen zengin bir hücre kaynağı, ve bu hücrelerin davranışını kontrol eden büyüme faktörlerini içermektedir. Laboratuvar ortamında canlı, fonksiyonel üç boyutlu kemik oluşturulmasını hedef alan kemik doku mühendisliğinde önemli nokta, doğal kemiğin yapısını ve rejenerasyon sürecini iyi bir şekilde taklit edebilmek ve üç boyutlu taşıyıcı üzerinde yeterli miktarda mineralize doku elde edebilmektir.

Kemiğin Yapısı ve Rejenerasyon Süreci

Kemik dokusu kompleks, organize ve mineralize bir bağ dokusudur. Kemiğin kolajen temelli yapılardan, hidroksiapatit kristallerinden ve olgun ve olgun olmayan kemik hücrelerinden (osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar) oluşan yüksek yapısal hiyerarşisi vardır. Kortikal ve trabeküler kemik bu bileşenlerin değişik şekilde yapılanmasıyla oluşmaktadır².

Yaşla birlikte potansiyeli azalmakla birlikte kemik içeriğindeki osteoklastların yıkıcı ve osteoblastların yapıcı aktivitesiyle sürekli olarak yeniden şekillenen bir dokudur. Bununla birlikte bir kırık ve hasar durumunda üç aşamalı bir iyileşme süreciyle kemik kendini tamir edebilmektedir. İlk

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ADANA.

** ODTÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA.

*** ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü, Biyo Teknoloji Araştırma Birimi, ANKARA.

aşamada oluşan hematoma içerisinde sentezlenen büyüme faktörleri osteoprogenitör hücrelerin defekt bölgesine göç etmesini ve kondroblastlar ile osteoblastlara farklılaşmalarını sağlayarak kemik rejenerasyon sürecini regüle etmektedir³. Bu ilk enflamasyon sürecinde olduğu gibi takip eden onarım ve şekillenme süreçlerinde de dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) ailesi büyüme faktörleri (özellikle kemik morfojenetik proteinleri, BMPler), insülin büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) zaman ve konsantrasyona bağlı bir şekilde sentezlenerek süreçlerin çeşitli farklı basamaklarını kontrol etmektedir⁴⁻⁶. Genellikle kırığı takip eden üçüncü haftada kırık bölgesinde bir köprü görevi gören yumuşak kallus oluşmakta ve daha sonra yeniden şekillenme süreciyle bu yapı önce lamellar kemik ve daha sonra sırasıyla trabeküler kemik ve kompakt kemik ile yer değiştirerek orijinal yapı ve güçte kemik oluşturmaktadır⁷.

Kemik Rejenerasyonunda Klinik Uygulamalar

Kemik, spontan iyileşme ve skar dokusu oluşturmadan rejenerasyon olabileceğine sahip bir doku olsa da bu rejenerasyon her zaman tam olarak gerçekleşmemektedir. Büyük defekler ve çok parçalı kırıklarda kemiğin rejenerasyon kapasitesi yetersiz kalabilmektedir⁸. Bunun gibi kaynamadan kalacak olan vakalarda kemik defekterinin çeşitli malzemeler ile doldurulması kemiğin iyileşmesinin tetiklenmesi ve bu süreçte yapısal ve mekanik destek sağlanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Günümüzde kemik trasplantasyonları tüm diğer organ trasplantasyonlarından beş kat daha fazla bir oranda yapılmaktadır⁹. Bu nedenle ideal bir kemik dolgu malzemesi veya fonksiyonel yapay kemik oluşturulması günümüzün önemli araştırma konularından bir tanesidir.

İdeal kemik dolgu malzemesi kemiğin defekt içine büyümesine olanak sağlayacak osteokondüktif bir matris, osteogenezisin gerçekleşmesi için canlı osteojenik hücreler ve hücreleri uyuracak osteoindüktif ajanlar içermelidir.

Özellikle uygulanan greftte osteojenik hücrelerin bulunması, cerrahi sonrası yumuşak kallus oluşumu öncelikle greftlenen hücreler ile sağlanabildiği için oldukça büyük öneme sahiptir⁹. Klinikte kullanılmakta olan çeşitli doğal ve sentetik greftler içerisinde osteojenik hücreleri içeren tek alternatif hastanın kendisinden alınan otojen greftlerdir ve altın standart olarak kullanılmaktadır. Ancak otojen greftlerin temininde donör saha morbiditesi ve kısıtlı kaynak gibi çeşitli problemler kullanımı sınırlandırmaktadır^{10,11}. Bu nedenle zaman içerisinde araştırmalar allogreftler, ksenogreftler, demineralize kemik matrisi, kadavra kemiği gibi diğer doğal greftleme yöntemleri konularına yoğunlaşmıştır¹². Ancak bu alternatiflerin hiçbirinde osteojenik hücreler bulunmamaktadır ve bununla birlikte yoğun sterilizasyon gerektirdiklerinden genellikle osteoindüktif özelliklerinin de kaybolmasıyla birlikte yalnızca yapısal destek sağlama amacını gütmektedirler¹³⁻¹⁵.

Doğal greftlerin kullanımındaki sınırlamalar nedeniyle çeşitli alternatifler üzerinde durulmuş ve malzeme bilimindeki gelişmeler ile de paralel olarak polimerik, seramik ve metalik yapıda sentetik greftlerin kullanımı klinikte oldukça yoğun uygulama alanı bulmuştur¹⁶. Özellikle polimerik biyomalzemeler sentetik kemik dolguları olarak sıklıkla kullanılmıştır. İlk jenerasyon polimerik biyomalzemeler 1980'li yıllardan itibaren inert olmaları ve vücutta yalnızca yapısal destek sağlamaları amaçlarıyla geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır¹⁷. Bu dönemde silikon, polietilen (PE), akrilik resinler, poliüretanlar (PU), polipropilen (PP) ve polimetilmetakrilat (PMMA) gibi malzemeler kullanım alanı bulmuştur^{18,19}. Ancak inert olan ve vücutla etkileşime girmeyen bu ilk jenerasyon biyomalzemelerin yabancı cisim reaksiyonu geliştirmesi gibi çeşitli sıkıntılara neden olması ve aynı zamanda biyoyumlu/biyobozunur polimerik malzemelerin de gelişimi ile 2000'li yıllardan itibaren ikinci jenerasyon biyoaktif biyomalzemeler kullanılmaya başlanmıştır. Bu dönemde polilaktik asit (PLA)²⁰, poliglikolik asit (PGA)²¹ ve kopolimerleri (PLGA)²², polikaprolakton (PCL)²³, polihidroksietilmetakrilat (PHEMA)²⁴ gibi sentetik biyomalzemelerin yanısıra kollajen²⁵, hiyaluronik asit²⁶, ipek²⁷, aljinat²⁸, nişasta²⁹, kitosan³⁰ ve polihidroksialkanoatlar³¹ gibi

doğal biyomalzemeler de başta ortopedik olmak çeşitli uygulamalar için sıklıkla kullanılmıştır. Yeni gelişmekte olan bir alan olan üçüncü jenerasyon biyomalzemeler ise moleküler seviyede düzenlenerek ve canlı hücreler ile birlikte kullanılarak fonksiyonel yapay doku ve organlar geliştirilmesini amaçlamaktadır³². Doku mühendisliği alanı bu biyomalzemelerin gelişimi ile ortaya çıkmış bir alan olup günümüzde özellikle deri ve kıkırdak gibi dokular için kliniğe geçen başarılı ürünler vermiştir. Laboratuvar ortamında doku mühendisliği yöntemi ile fonksiyonel yapay kemik dokusu oluşturulması amacıyla çok sayıda araştırma yürütülmektedir.

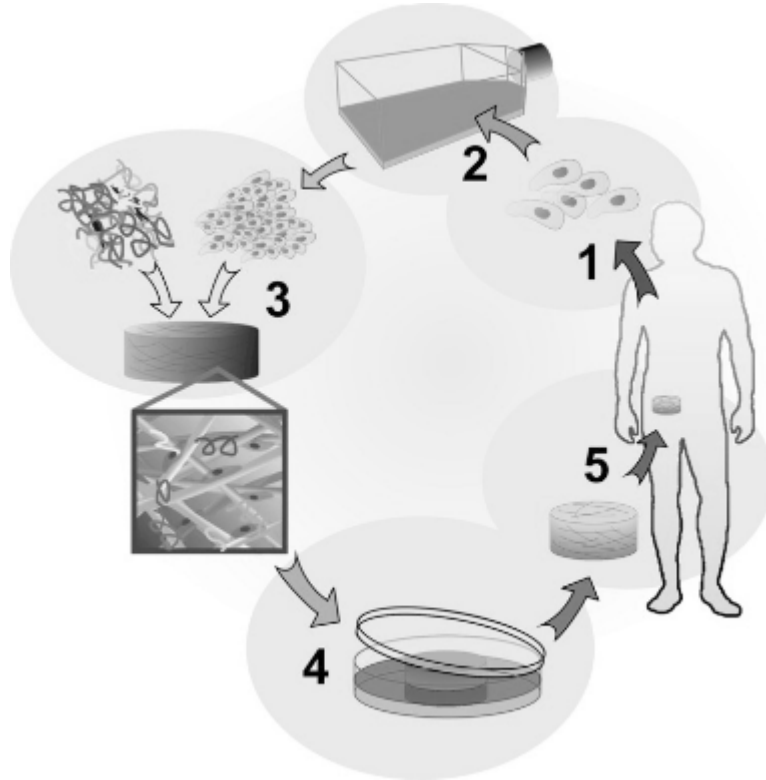
Kemik Rejenerasyonunda Alternatif Yöntem: Doku Mühendisliği

Tüm greft materyallerine alternatif olarak doku mühendisliği yöntemi laboratuvar ortamında, ikincil operasyonlara gerek bırakmayan ve immun reaksiyon geliştirmeyen canlı ve fonksiyonel yapay kemik dokusu geliştirilmesini amaçlamaktadır. Yöntemde canlı hücreler, polimerik biyomalzemeler ve indüktif ajanlar birarada kullanılmaktadır.

Doku mühendisliğinin stratejisi izole edilen hücrelerin in vitro ortamda çoğaltıldıktan sonra hedef bölgenin yapısal ve mekanik özelliklerine uygun olarak hazırlanmış biyobozunur bir taşıyıcı üzerine ekilmesi ve bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını kontrol eden büyüme faktörlerinin eklenmesiyle laboratuvar ortamında mineralize doku elde edilmesi ve defekt bölgesine nakledilmesidir (Şekil 1). İmplantasyonu takiben doğal kemik gözenekli yapı içerisine büyüüp geliştikçe ve hücreler kendi hücre dışı matrislerini oluşturdukça biyobozunur malzeme bozularak ortamdaki ayrılacak, ve doğal kemik implant ile yer değiştirecektir.

Yöntemde, hücre kaynağı olarak primer hücreler veya kök hücreler kullanılabilir. Birlikte, araştırma uygulamalarında hücre hatları ve osteosarkom hücreleri de kullanılabilir. Bunlar arasında osteoprogenitör veya mezenkimal kök hücreler yüksek çoğalma ve farklılaşma yetenekleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır^{33,34}. Bu hücreler kemik iliği, adipoz doku, damar duvarı, periferik ve menstrual kan, fetal ve maternal

plasenta, periodontal ligaman, periost ve trabeküler kemik gibi birçok kaynaktan izole edilebilmekle birlikte tüm bu kaynaklardan izole edilen hücreler tam olarak karakterize edilmemiştir. Kemik iliği bu kök hücrelerin en yaygın olarak bulunduğu ve en çok karakterize edilmiş kaynaktır ve uygun indüktif ajanlar varlığında yüksek osteoblasta farklılaşma özelliğine sahip hücreler buradan kolaylıkla izole edilebilmektedir.³⁵

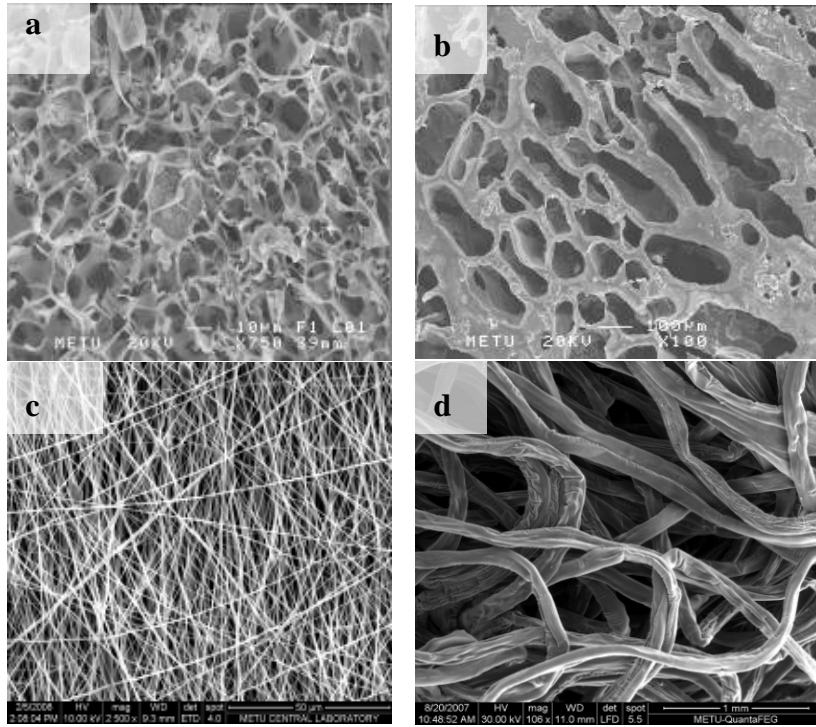


Şekil 1. Doku mühendisliği yaklaşımı. (1) Kaynak hücre izolasyonu, (2) Hücrelerin in vitro çoğaltılması, (3) Hücrelerin üç boyutlu taşıyıcı yapıya ekilmesi, (4) In vitro kültür ve üç boyutlu yapay dokunun oluşturulması, (5) Hedef bölgeye implantasyon.

Doku mühendisliği yöntemiyle yapay kemik oluşturulmasında hücre taşıyıcısı ve doku desteği olarak kullanılacak yapıların hazırlanmasında polimerler, seramikler ve kompozitleri kullanılmaktadır. Kullanılacak olan malzeme biyouyumlu, biyobozunur bir malzeme olmalıdır ve bozunma ürünleri sitotoksik olmamalıdır. Ayrıca, dokunun iyileştiği hızla doğru orantılı olarak bozunma göstermelidir. Mekanik gücü hedef bölgeye uygun, kemik iyileşme sürecinde yapısal bütünlüğünü koruyan, osteokondüktif özellikte ve defekt bölgesine yapısal ve mekanik olarak tam bir uyum gösteren malzemeler kullanılmalıdır. Dokunun yapı içerisinde gelişmesine ve ayrıca damarlanma ile sinirlenmeye izin verecek ölçüde gözenekli olmalı ve kemiğin doğal üç boyutlu yapısını taklit edebilmelidir^{36,37}. Bu özelliklere sahip doku desteklerinin hazırlanmasında özellikle doğal ve sentetik birçok biyobozunur ve biyouyumlu polimer sıklıkla uygulama alanı bulmaktadır. Kollajen, ipek, aljinat, nişasta, kitosan, jelatin ve polihidroksialkanoatlar gibi doğal polimerler vücutla biyolojik ve kimyasal uyumları nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak hazırlanmaları ve bulunmaları daha kolay olan ve düşük maliyetle yüksek miktarda üretilen sentetik biyobozunur polimerlerin de doku destekleri hazırlanmasında büyük kullanımı vardır. PLA, PGA, PLGA gibi poli(α -hidroksiester)ler, poli(hidroksibütirat-ko-hidroksivalerat) (PHBV), PCL, polipropilen fumarat (PPF) ve polietilen glikol (PEG) gibi polimerler uygulanmaktadır. Literatürde sentetik ve doğal polimerlerden elde edilen matrisler üzerinde kemik hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasını konu alan bir çok çalışma bulunmaktadır^{23, 38-40}.

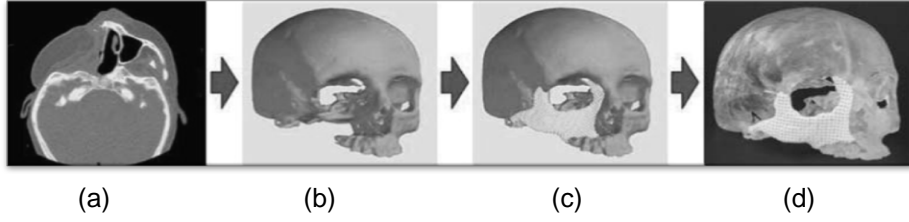
Üç boyutlu doku desteklerinin tasarımında önem taşıyan parametreler arasında ortalama gözenek boyutu, gözeneklilik, osteoindüksiyon ve/ya osteokondüksiyon ile kemik büyümesini indüklenme, şekil itibarıyla hedef bölgeye uyum sağlayabilme, biyobozunma ve mekanik özellikler sayılabilir. Kemik doku mühendisliğinde hücre taşıyıcısı olarak en fazla incelenen yapılar arasında köpük yapısı olmakla birlikte fiber yapıdaki üç boyutlu hücre taşıyıcıları son yıllarda giderek artan bir önem kazanmıştır.⁴¹⁻⁴³ Poli(L-laktik asit) (PLLA), PLGA ve PHBV gibi sentetik polimerlerden üretilen köpük

yapıları osteoblast hücreleriyle yapay kemik dokusu üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Şekil 2a, b).⁴⁴ Diğer taraftan, insan hücrelerinin fiber yapılar üzerinde tutunma, büyüme ve farklılaşma davranışlarının çok düzgün bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. Köpüklerde olduğu gibi çeşitli doğal ve sentetik polimerler ve bunların karışımları fiber hazırlanmasında kullanılmıştır. Elektroejirme (electrospinning) (Şekil 2c) ve ıslak eğirme (wet spinning) (Şekil 2d) metotları fiber yapıda üç boyutlu hücre taşıyıcısı hazırlanmasında en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir ve bu yöntemlerle nano - ve mikro-boyutta fiberler hazırlanabilmektedir^{45,46}.



Şekil 2. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli üç boyutlu doku destek yapıları. (a) PLLA gözenekli, üç boyutlu köpük yapısı, (b) PHBV gözenekli, üç boyutlu köpük yapısı, (c) PHBV-P(L-D,L)LA elektroejirme yöntemi ile hazırlanmış nanolifler, (d) kitosan ıslak eğirme yöntemi ile hazırlanmış mikrolifler.

Köpük ve fiber yapılar gibi geleneksel doku desteği hazırlama yöntemleri ile hazırlanan yapılar genellikle önceden belirlenmiş homojen bir yapı oluşturamamaktadır. Oysa, doku destek malzemelerinin şekil, yapı ve mekanik özelliklerini kontrol edebilmek hedef doku ile uyumun sağlanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Hızlı prototipleme (rapid prototyping) yöntemi, hedef bölgenin bilgisayarda hazırlanan üç boyutlu çizimlerinden direkt olarak elle tutulur fiziksel hücre taşıyıcısı elde edilerek bölgeye yapısal ve mekanik olarak ideal bir şekilde uyum sağlayacak doku destekleri üretebilmesi nedeniyle günümüzde giderek artan bir önem taşımaktadır (Şekil 3)⁴⁷. Yöntem, üç boyutlu yapıların bir bilgisayar kontrollü cihaz kullanılarak üst üste biriktirilen malzeme katmanlarıyla oluşturulması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle oluşturulan doku desteklerinin gözeneklilik, gözenek boyutu, sertlik ve geçirgenlik gibi özellikleri tam olarak kontrol edilebilmektedir. İstenilen yapısal özelliklere sahip matris oluşturulabilmesiyle birlikte yöntem doku desteği geometrisinin hücre davranışı üzerindeki etkilerinin incelenmesi ve taşıyıcı tasarımının optimize edilemesine de olanak sağlamaktadır.



Şekil 3. Hızlı prototipleme yöntemi ile kişiye özel doku destekleri oluşturulması. (a) CT, MRI taramaların yapılması, (b) Defekt yapısının belirlenmesi, (c) Defekte tam uyum sağlayacak destek yapının bilgisayar modelinin geliştirilmesi, (d) hızlı prototipleme yöntemiyle hedef bölgeye tam uyum sağlayacak destek malzemesinin hazırlanması.

Doku mühendisliği yönteminde üçüncü önemli eleman olan büyüme faktörleri hedefe uygun bir şekilde hazırlanan ve hücre içeren matrislerin işlevselliğinin kontrol edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Büyüme faktörleri in vivo ortamda hücre davranışlarını regüle eden biyolojik açıdan etkin

moleküllerdir ve dışarıdan kültür ortamına eklenmelerinin kemik iyileşmesini arttırdığı, hücre çoğalma ve farklılaşmasını kontrol ettiği ve damarlanmayı tetiklediği gözlemlenmiştir. Ancak büyüme faktörleri çok düşük derişimlerde etkin, bozunmaları ve parçalanmaları görece hızlı fragil moleküllerdir. Bu nedenle, bir taşıma sisteminin içinde bulunmaları korunmaları açısından gereklidir. Büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemler içerisine hapsedilmesi ve kontrollü salımlarının sağlanması hem biyoaktif faktörü kullanım alanında lokalize edecek, hem bozunmadan koruyacak hem de gerekli miktarın süre içerisinde kontrollü bir şekilde ortama sağlanmasını gerçekleştirerek kullanılan toplam miktarın azaltılmasında etkili olacaktır. Bu amaçla çeşitli büyüme faktörlerinin doku destekleri ile birleştirilmesini ve defekt bölgesinde lokalizasyonunu amaçlayan çeşitli çalışmalar sürdürülmüştür⁴⁸⁻⁵⁰.

Daha önce bahsedildiği gibi, doğal kemik gelişim ve kırık iyileşme süreçlerinde BMPler, IGF, FGF ve VEGF gibi faktörler birarada etki göstererek süreci regüle etmektedir. Bunlar arasında, BMP moleküllerinin mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik hücrelere farklılaşmasını tetikleyerek kemikleşme sağladığı gösterilmiş olup bu molekül ailesi içindeki en etkili ajanların BMP-2 ve BMP-7 olduğu belirtilmiştir ve klinik olarak kullanımları FDA onaylıdır⁵¹. Etki mekanizmaları incelendiğinde BMP-2 molekülünün kırık sonrası birinci gün, BMP-7'nin ise ikinci haftada maksimum seviyede sentezlendiği görülmüştür⁵². Bu nedenle, bunların doğal süreçte olduğu gibi zamanlamalarının taklit edilerek ortama bu aralıklarla verilmesinin klasik uygulamalarda olduğu gibi bir anda verilmelerine göre çok daha etkili olacağı düşünülmüştür.

Ancak doku mühendisliğinde büyüme faktörlerinin doğal bulunma sürelerinin taklit edilerek ortama zamana bağlı bir şekilde sunulması etkin bir biyomimetik yaklaşım olacağı halde literatürde birden fazla biyoaktif molekülün aynı destek matrisinden salımını gerçekleştirerek çok fonksiyonlu yapılar elde edilmesi konusunda fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bulunan az sayıdaki çalışmaların bir kısmı BMP-2 ve TGF- β 3'ün aljinat hidrojellerden salımı⁵³. BMP-2 ve VEGF'in jelatin mikroparçacıklar içerisine

hapsedilmesinin ardından gözenekli destek matrisi içerisine eklenmesi,⁵⁴ BMP-2 ve IGF-1'in iki katmanlı çapraz bağlı jelatin kaplamalardan salımının⁵⁵ bu faktörlerin tek başına salımına kıyasla kemik rejenerasyonundaki pozitif etkisini göstermiştir. Kemik iyileşmesinde en etkili faktörler oldukları bilinen BMP-2 ve BMP-7 moleküllerinin doğal bulunma zamanlarının taklit edilerek aynı yapıdan sıralı salımlarının sağlanması üzerine araştırma grubumuz çeşitli çalışmalar gerçekleştirmiştir. Bu iki molekülün polielektrolit kompleks mikrokürelerden,⁵⁶ polimerik nanokapsüllerden⁵⁷ ve bu kapsüllerin kitosan³⁰ ve PCL⁵⁸ yapılarına entegrasyonu ile üç boyutlu yapılardan sıralı olarak salımının tek veya bir arada salımlarına oranla in vitro ortamda kemik oluşumunu anlamlı bir şekilde arttırdıkları bulunmuştur.

Sonuç

Fonksiyon görmeyen veya hasar görmüş doku ve organların sağlıklı doku ve organlarla değiştirilmesi dünya çapında ciddi bir sağlık sorunudur. Bunun için altın standart olarak kişinin sağlıklı bölgesinden alınan greftler hasarlı bölgeye nakledilmekte veya kişiye yakın bir kişiden transplantasyon yapılmaktadır. Organ transplantasyonlarıyla ilgili kısıtlı kaynak ve doku uyumsuzluğu gibi ciddi sıkıntıların olması ise araştırmacıları yeni arayışlara itmiştir. Doku mühendisliği, nakledilecek organların laboratuvar ortamında hastanın kendi hücrelerini kullanarak yapay bir şekilde oluşturulmasını amaçlayan bir araştırma alanıdır ve son 20-30 yılın en önemli konularından biri haline gelmiştir. Ancak bu yöntemle canlı dokuya tasarım olarak birebir benzeyen yapılar oluşturulmuş olsa da bunların nakledildikten sonra fonksiyonel olmaması yönündeki sorunlar aşılmaya çalışılmaktadır. Günümüzde doku mühendisliği yöntemiyle birçok doku ve organı üretebilmek için çok ciddi çalışmalar olsa da klinikte yalnızca deri ve kıkırdak uygulaması yapılabilmektedir. Bunun nedeni bu dokuların fazla fonksiyonellik gerektirmemesi, diğer dokular kadar fazla damarlanma ve sinirlenmeye ihtiyaç duymamasıdır. Klinikte kemik greftleri diğer tüm organ transplantasyonlarının yaklaşık beş katı fazla bir oranla kullanılmaktadır ve fonksiyonel bir kemik dolgusu veya

yapay kemik ciddi bir klinik ihtiyaçtır. Şu anda literatürde doku mühendisliği yöntemiyle yapay kemik oluşturulması yönünde çok sayıda çalışma olmasına rağmen henüz fonksiyonel üç boyutlu yapıların oluşturulması için gerekli hücre organizasyonu ve aktivitelerinin kontrolü sağlanamadığı için klinik uygulamaya geçen bir ürün olmamıştır. Bu sorunu çözmek amacıyla çalışmalar hücre davranışlarını tetikleyecek ve kontrol edecek gerekli biyoaktif ajanların salımını sağlayabilen multi-fonksiyonel doku destekleri oluşturulması üzerine yoğunlaşmıştır.

Kaynaklar

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–926.
2. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR et.al. Bone biology Part II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg* 1995; 77-A: 1276-1283.
3. Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair- Part I: Biochemical Signaling Molecules. *Tissue Eng Part B* 2008; 14(3): 259-273.
4. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrazi MD et. al. Growth Factors in Bone Matrix. *J Biol Chem* 1986; 261(27): 12665-12674.
5. Marden LJ, Fan RS, Pierce GF et. al. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Investig* 1993; 92: 2897- 2905.
6. Cowan CM, Soo C, Ting K et. al. Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2005; 66: 239-285.
7. Marieb EN, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology 7th Edition*, San Francisco, Benjamin Cummings, 2007.
8. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 2003; 8: 980-989.
9. Sutherland D, Bostrom M. *Grafts and Bone Graft Substitutes, from Bone regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Ed. Lieberman J.B., Friedlaender G.E, Humana Press, USA, 133-156. 2005.
10. Nystrom E, Ahlqvist J, Legrell PE et al. Bone graft remodelling and implant success rate in the treatment of the severely resorbed maxilla: a 5-year longitudinal study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(2): 158-164.
11. Younger EM, Chapman M. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-195.
12. Mankin HJ, Springfield DS, Gebhardt BC et al. Current status of allografting for bone tumors. *Orthopedics* 1992; 15: 1147-1154.
13. Tomford W, Springfield DS, Mankin HJ. Fresh and frozen articular cartilage allografts. *Orthopedics* 1992; 15: 1183-1188.

14. Ohlendorf C, Tomford W, Mankin HJ. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res* 1996; 14: 413-416.
15. Peterson B, Whang PG, Iglesias R et. al. Osteoinductivity of Commercially Available Demineralized Bone Matrix. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86: 2243-2250.
16. Navarro M, Michiardi A, Castano O, et.al. Biomaterials in orthopaedics. *R Soc Interface* 2008; 5: 1137–1158.
17. Hench LL. Biomaterials. *Science* 1980; 208: 826–831.
18. Fisher J, Dowson D. Tribology of total artificial joints. *Proc Inst Mech Eng J Eng Med* 1991; 205: 73–79.
19. Sutula LC, Collier JP, Saum KA, et. al. Impact of gamma sterilization on clinical performance of polyethylene in the hip. *Clin Orthop* 1995; 319: 28–40.
20. Kinoshita Y, Kobayashi M, Hidaka T, et. al. Reconstruction of mandibular continuity defects in dogs using poly (L- lactide) mesh and autogenic particulate cancellous bone and marrow: Preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(7): 718-724.
21. Kellomäki M, Niiranen H, Puumanen K, et. al. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2495-2505.
22. Goldstein AS, Zhu G, Morris GE, et. al. Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds. *Tissue Eng* 1999; 5(5): 421-433.
23. Yilgor P, Sousa RA, Reis RL, et. al. 3D Plotted PCL Scaffolds for Stem Cell Based Bone Tissue Engineering. *Macromol Symp* 2008;269:92-99.
24. Costa ROR, Pereira MM, Lameiras FS, et. al. In vitro study of apatite precipitation on poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-silica hybrids with controlled surface areas. *Key Engineering Materials* 2003; 240-242: 195-198.
25. Vrana NE, Builles N, Justin V, et. al. Development of a reconstructed cornea from collagen-chondroitin sulfate foams and human cell cultures. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008; 49(12):5325-5331.
26. Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, et al. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials* 2002; 23(4): 1043-1051.
27. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, et. al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005; 37(5): 688-698.
28. Wang L, Shelton RM, Cooper PR, et al. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(20): 3475-3481
29. Marques AP, Reis RL, Hunt JA. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: In vitro studies. *Biomaterials* 2002; 23(6): 1471-1478.
30. Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, et. al. Incorporation of a Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery System into Chitosan-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 2009; 30: 3551–3559.
31. Kose GT, Kenar H, Hasirci N, et. al. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(11): 1949-1958.
32. Hench L, Polak J. Third generation biomedical materials. *Science* 2002; 295: 1014–1017.

33. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; 13: 81–88.
34. Caplan AL. Method for enhancing the implantation and differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells. 1993. US patent 5197985.
35. Nefussi JR, Brami G, Modrowski D, et. al. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 493–503.
36. Spaans CJ, Belgraver VW, Rienstra O, et al. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials* 2000; 21: 2453–2460.
37. Boccaccini AR, Roether JA, Hench LL, et. al. Composites approach to tissue engineering. *Ceram Eng Sci Proc* 2002; 23: 805–816.
38. Kenar H, Kose GT, Hasirci V. Tissue Engineering Of Bone On Micropatterned Biodegradable Polyester Films. *Biomaterials* 2006; 27: 885–95.
39. Kose GT, Korkusuz F, Korkusuz P, et al. In vivo tissue engineering of bone using poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds. *Tissue Eng* 2004; 10(7-8): 1234-1250.
40. Ber S, Kose GT, Hasirci V. Bone tissue engineering on patterned collagen films: An in vitro study. *Biomaterials* 2005; 26(14): 1977-1986.
41. Hasirci V, Vrana E, Zorlutuna P, et. al. Nanobiomaterials: a review of the existing science and technology, and new approaches. *J Biomater Sci Polymer Edn* 2006; 17 (11): 1241–1268.
42. Ashammakhi N, Ndreu A, Piras AM, et. al. Biodegradable nanomats produced by electrospinning: expanding multifunctionality and potential for tissue engineering. *J Nanosci Nanotech.* 2007;7(3):862-882.
43. Tuzlakoglu K, Reis RL. Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(7):1279-1286.
44. Murphy WL, Peters MC, Kohn DH, et. al. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21(24):2521-2527.
45. Xin X, Hussain M, Mao JJ. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials* 2007;28(2):316-325.
46. Tuzlakoglu K, Alves CM, Mano JF, et. al. Production and characterization of chitosan fibers and 3D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol Biosci* 2004; 4:811-819.
47. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: Rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol* 2004; 22(7): 354-362.
48. Hsu HP, Zanella JM, Peckham SM, et.al. Comparing Ectopic Bone Growth Induced by rhBMP-2 on an Absorbable Collagen Sponge in Rat and Rabbit Models. *J Orthop Res* 2006;24:1660–1669.
49. Jansen JA, Vehof JWM, Ruhe PQ, et. al. Growth Factor-Loaded Scaffolds For Bone Engineering. *J Contr Release* 2005;101:127–136.

50. Keskin DS, Tezcaner A, Korkusuz P, et. al. Collagen–chondroitin sulfate-based PLLA–SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials* 2005;26:4023-4034.
51. White AP, Vaccaro AR, Hall JA, et. al. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, non-unions and spinal fusion. *Int Orthop* 2007; 31: 735-741.
52. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 513–520.
53. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, et. al. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004;35:562-569.
54. Patel ZS, Young S, Tabata Y, et. al. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 2008;43:931–940.
55. Raiche AT, Puleo DA. In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials* 2004;25:677–685.
56. Basmanav FB, Kose GT, Hasirci V. Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 4195–4204.
57. Yilgor P, Hasirci N, Hasirci V. Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery from Polyester Nanocapsules. *J Biomed Mater Res* 2010; 93A: 528-536.
58. Yilgor P, Sousa RA, Reis RL, et. al. Effect of Scaffold Architecture and BMP-2/BMP-7 Delivery on in vitro Bone Regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21; 2999-3008.

Yazışma Adresi :

Uzm. Dr. Pınar Yılıgör Huri
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana

Tel: 0322 338 60 60/3466
e-posta: phuri@cu.edu.tr