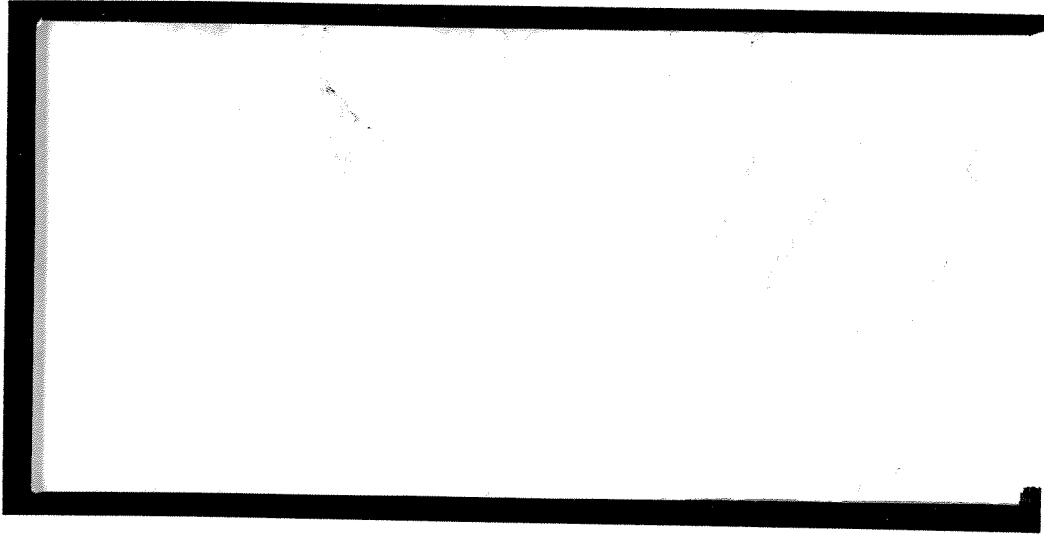


2002-226 DÜP



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



**Makina, Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri  
Araştırma Grubu**

**Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material  
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant  
Committee**

**YAPAY KIKIRDAK OLUŞTURULMASINDA  
ÜÇ BOYUTLU BİYOPOLİMERİK YAPILARIN  
KULLANILMASI**

**PROJE NO: MİSAG-158**

**Prof.Dr. Feza KORKUSUZ  
Prof. Dr. Vasıf HASIRCI  
Doç. Dr. Muhterem BAHÇE  
Doç. Dr. Hasan BİLGİLİ  
Y. Doç. Dr. Cemil YILDIZ  
Dr. Gamze TORUN-KÖSE  
Ar. Gör. Yasemin SOYSAL**

**HAZİRAN 2002  
ANKARA**

## Önsöz

Doku mühendisliği günümüzde kayıp organların veya yetmezliklerinin tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerin arasına girmiştir. Mühendislik ürünü organ veya dokuların güncel uygulama alanlarından birisi yük taşıyan ve mekanik işlev gören eklem kıkırdağıdır. Eklem kıkırdağı kondrosit adı verilen tek tip hücre içermekte olup mekanik işlevini hücrelerarası ağ üzerinden gerçekleştirmektedir. Sınırlı iyileşme özelliği nedeniyle son yıllarda araştırmacıları yapay kıkırdak üretilmesinin üzerine eğilmiştirlerdir.

Çalışmamızda üzerinde biyomimetik olarak kalsiyum fosfat oluşturulmuş jelatinden ve biyobozunur polihidroksibütirattan köpükler geliştirilmiş ve bunlara kondrositler yüklenmiştir. Canlı hücre içeren bu köpüklerin in vitro ve in vivo koşullardaki özellikleri ayrıntılarıyla incelenerek doku mühendisliği ürünü malzemelerin gelecekte kıkırdak dokusu yaralanmalarında tedavi amacıyla kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Projede sağlık bilimleri, temel bilimler ve mühendislik bilimlerinin bilgi birikimleri, insan kaynakları ve alt yapılarından birlikte yararlanılmıştır. Projede kullanılan köpükler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Biyoteknoloji Araştırma Biriminde Prof. Dr. Vasıf Hasırcı ve Dr. Gamze Köse tarafından hazırlanmıştır. Hücre kültürleri Gülhane Askeri Tıp Akademisinde Y. Doç. Dr. Cemil Yıldız, Doç. Dr. Muharrem Bahçe ve Ar. Gör. Yasemin tarafından gerçekleştirilmiş ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Biyoteknoloji Araştırma Birimi tarafından da desteklenmiştir. In vivo deneyleri Y. Doç. Dr. Cemil Yıldız, Doç. Dr. Hasan Bilgili ve Ar. Gör. Taner Özdemir tarafından gerçekleştirilmiştir. Western blot analizlerinin gerçekleştirilmesini Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Aykut Özkul üstlenmiştir.

Disiplinlerarası ve çok merkezli çalışmanın sonuçları temel bilimler, malzeme bilimleri ve sağlık bilimlerinin tıp ve veteriner hekimliklerince kullanılabilecektir.

Çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunca (MISAG-158) desteklenmiştir.

Prof. Dr. Feza Korkusuz  
Proje Yöneticisi

İçindekiler

Önsöz		ii
İçindekiler		iii
Tablo ve Şekil Listeleri		v
Özet		1
İngilizce Özet		2
Giriş		3
Literatür Özeti		8
Amaçlar		16
Gereç ve Yöntemler		16
	Gereçler	
	Makine Teçhizat	16
	Sarf Malzemesi	16
	Kimyasallar	17
	Yöntemler	
	Yapay ağ üretimi ve karakterizasyonu	17
	Kalsiyum fosfat içeren kollagen ağ üretimi	17
	Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV8, % 8 HV İçeren PHBV)'den süngersi ağ üretimi ve yüzey modifikasyonu	17
	Malzemelerin karakterizasyonu	18
	SEM ve EDS	18
	Bilgisayarla Gözenek Boyutları Dağılımı Analizi	18
	İç Hacim Ölçümü	18
	Temas Açısı Ölçümü	18
	Degradasyon Çalışması	18
	Kıkırdak doku örneklerinden kondrosit hücrelerinin ayrıştırılarak üretilmesi ve karakterizasyonu	19
	Kıkırdak Doku Örneğinin Alınması	19
	Doku Örneğinin Laboratuara Nakli	19
	Mekanik Parçalama İşlemi	19
	Enzimatik Ayrıştırma	19
	Kondrositlerin Canlılığının Saptanması ve Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi	19
	Hücrelerin İnkübasyonu	19
	Tripsinizasyon İşlemi ve Alt (Sub) Kültürler	20
	Kondrositlerin Tanınması	20
	Kondroblast Hücrelerin Parçalanması	20
	Kollagen II'nin Western Blot Yöntemiyle Saptanması	20
	Destek ağlar üzerine <i>in vitro</i> koşullarda kondrositlerin yüklenmesi ve incelenmesi	21
	Tavşan kökenli kıkırdak hücrelerinin elde	21

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

	edilmesi	
	Mikroskopik inceleme	21
	Yapay ağ ve hücre kompozitlerinin <i>in vivo</i> kıkırdak defektlerine implante edilerek işlevliliğinin saptanması	22
Bulgular	Malzeme ve Hücrelerin İncelenmesi	22
	SEM ve EDS	22
	Bilgisayarla Gözenek Boyutları Dağılımı Analizi	23
	Temas Açısı Ölçümü	23
	İç Hacim Ölçümü	23
	Degradasyon Çalışması	23
	Kondrositlerin Karakterizasyonu	23
	Hücre İçeren Yapay Ağların <i>In Vitro</i> İncelenmesi	24
	Makroskopik Bulgular	24
	Mikroskopik Bulgular	24
	Hücre İçeren Yapay Ağların <i>In Vivo</i> İncelenmesi	25
	Makroskopik Bulgular	25
	Mikroskopik Bulgular	25
Tartışma		26
Sonuç ve Katkıları		26
Kaynaklar		28
Tablolar ve Şekiller		32

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

## Tablo ve Şekillerin Listesi

### Tablolar

Tablo 1.	PHBV8 ve Gelfix matrikslerinin gözenek hacimleri.	
Tablo 2.	PHBV matrikslerinin 180 günlük degradasyon süresince kalınlık ölçümleri.	
Tablo 3.	Histopatolojik bulguların değerlendirmesi.	

### Şekiller

Şekil 1.	Gelfix <sup>®</sup> Kollajen örgüsünün taramalı electron mikroskopta görüntüsü. 100x	
Şekil 2.	Ca-P Gelfix <sup>®</sup> Kollajen örgüsünün SEM görüntüsü. 100x	
Şekil 3.	PHBV8'in SEM görüntüsü. 100x	
Şekil 4.	PHBV8'in gözenek yapısı. 100x	
Şekil 5.	Tavşanların omuz eklemlerinden kıkırdak dokusunun alınması.	
Şekil 6.	Ca-P Gelfix matriksinin yapısındaki kalsiyum ve fosfat oranları.	
Şekil 7.	PHBV 8 matrikslerinin degradasyonu sonucunda oluşan ortam pH değişiklikleri : a) 4 %, b) 6 %, c) 8 %, d) yüklenmemiş PHBV8, e) sükrözose yüklenmiş PHBV8.	
Şekil 8.	Kondrositlerin tip 2 kollagen sentezlemesinin Western Blot yöntemiyle saptanması.	
Şekil 9.	(a) Sitolojik örnekte zeminde miksokondroid görünümde vakuol içinde binükleer kondrositler. PAP 400x; (b) Kondrosit hücre bloğu. HE 40x, HE 400x	
Şekil 10.	Kıkırdak defektin oluşturulması (a) ve yapay ağın yerleştirilmesi (b).	
Şekil 11.	Yapay ağ ve hücrelerin birlikte uygulandığı bölgede tama yakın kapanma.	
Şekil 12.	Sekiz haftalık takipte polimer çevresinde fibröz doku, minimal yabancı cisim reaksiyonu ve neovaskülerizasyon oluşumu. HE 25x ve 100x.	
Şekil 13.	Sekiz haftada gözlenen kondrogenez. HE 25x.	
Şekil 14.	20 haftalık takipte hücre içeren ağın içerisinde yeni kıkırdak oluşumu. HE 25x	

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

## Özet

### YAPAY KIKIRDAK OLUŞTURULMASINDA ÜÇ BOYUTLU BİYOPOLİMERİK YAPILARIN KULLANILMASI

Sınırlı iyileşme yetisi olan eklem kıkırdağının yaralanmalarında doku mühendisliği ürünü olan yapay ağların kullanılması güncel araştırma konularındandır. Bu amaçla pekçok yapay ağ üretilmiş olmakla birlikte ideal bir ağ henüz tanımlanmamıştır. Bu çalışmanın amaçları (a) kondrositlerin üzerinde üreyerek yaşayabileceği yapay destek ağların (matriks) üretilmesi ve karakterizasyonu, (b) Kıkırdak doku örneklerinden kondrosit hücrelerinin ayırıştırarak üretilmesi ve karakterizasyonu, (c) Destek ağlar üzerine *in vitro* koşullarda kondrositlerin yüklenmesi ve incelenmesi ve (d) Bu ağ ve hücre kompozitlerinin *in vivo* kıkırdak defektlerine implante edilerek işlevlerinin saptanmasıdır. Çalışma çerçevesinde kalsiyum fosfat içeren kollagen ve Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV8, % 8 HV İçeren PHBV)'den süngersi ağlar üretilmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* ortamlarda incelenen hücre ve ağ kompozitlerinin ideal bir taşıyıcı sistem olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. *In vivo* ortamda 8 ve 20 hafta takip edilen polimer kompozitlerin dokuda çok az yabancı cisim yanıtı oluşturduğu ve kıkırdak iyileşmesini sağlayabildikleri gözlenmiştir. Sonuç olarak üretilen polimer ve kollagen ağların gelecekte insanların kıkırdak yaralanmalarında kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kıkırdak, doku mühendisliği, kollagen, polimer, hücre kültürü, kondrosit

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

**İngilizce Özet**

**Development of Three-Dimensional Polymeric Matrices for use in  
Tissue Engineered Cartilage**

Joint cartilage has a limited capacity of regeneration and artificial matrices for cartilage repair are current topics of research. The ideal matrix for cartilage repair has not been attained so far. The aims of this study were (a) Matrix production and characterization for chondrocyte seeding, (b) Chondrocyte isolation, production and characterization, (c) Assessment of chondrocyte and matrix interaction, and (d) implantation of the chondrocyte-matrix composites into cartilage defects established in rabbits. Ca-P collagen and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV8) matrices were produced for this reason. Both matrices were ideal materials for chondrocyte seeding and transfer. In vivo results at 8 and 20 weeks with chondrocyte seeded PHBV8 matrices revealed minimal foreign body reaction. These matrices were effective in cartilage regeneration. These matrices and they have great potential for use in the repair of joint cartilage defects in the near future.

Key Words: Cartilage, Tissue Engineering, Collagen, Polymer, Cell Culture, Chondrocyte

<b>Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı</b>	<b>İMZASI</b>	<b>TARİH</b>
<b>Feza KORKUSUZ</b>		<b>26 Kasım 2001</b>



## Giriş

Doku mühendisliği günümüzde kayıp organların veya yetmezliklerinin tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerin arasına girmiştir. Yapay doku veya organ üretiminde hücre kültürü teknikleri ve malzeme bilimindeki gelişmeler birlikte kullanılmaktadır. Ortopedi ve travmatoloji mühendislik ürünü dokuların yaygın olarak kullanılabilmesi önemli bir alandır. Kas ve iskelet sisteminin kıkırdak, bağ ve tendon dokuları organize onarım dokusuyla iyileşmektedir. Organize onarım dokusu orijinal dokunun fizyolojik ve mekanik özelliklerini tam olarak taşımamaktadır. Sonuçta kronik seyirli yetesizlikler ortaya çıkabilmektedir (BUCKWALTER, 1998). Doku mühendisliğinin bu alandaki temel amacı yaralanmalı bölgede tamamen normal bir doku yenilenmesinin sağlanmasıdır (VACANTI, 2000).

Mühendislik ürünü organ veya dokuların güncel uygulama alanlarından birisi yük taşıyan ve mekanik işlev gören eklem kıkırdağıdır. Günümüzde işlevsel ve biyolojik anlamda doğal eklem yerini tam olarak alabilecek bir yapı henüz geliştirilememiştir. Eklem temel olarak kapsül, bağ, menisküs, subkondral kemik, sinoviyal membran, kıkırdak gibi farklı dokuların birlikteliğinden oluşmuştur. Bu dokular içerisinde işlevsel kapasite ve morfolojik özellikleri açısından en karmaşık yapı eklem kıkırdağıdır. Eklem kıkırdağının kalınlığı, hücre yoğunluğu, ağ (matriks) yapısı ve mekanik özellikleri sadece canlılar arasında veya aynı canlıdaki farklı eklemler arasında değil, aynı eklem farklı bölgeleri arasında da değişiklik göstermektedir. Birkaç milimetre kalınlığında olmasına karşın eklem kıkırdağının kompresyon karşısında direnç gösterme, yükleri yüzeye dağıtma, subkondral kemiğe binen yükü azaltmak gibi önemli mekanik işlevleri vardır. Eklem kıkırdağı doğrudan yüklenmeye karşı yüzey alanını genişleterek yanıt vermekte ve gelen stresi azaltmaktadır. Ağ bu özelliğini sıvı bölümden almaktadır. Sıvı ağ gelen yükü karşılayarak makromoleküler ağ iskeletini ve kondrositleri mekanik travmadan korumaktadır.

Eklem kıkırdağı, diartrodial eklem fonksiyonlarını sürdürebilmesi için vazgeçilmez bir dokudur. Günlük yaşam içinde oldukça yüksek yükler eklem kıkırdağı tarafından karşılanmakta ve soğurulmaktadır. Örneğin orta hızlarda koşan bir kişinin eklem kıkırdağına vücut ağırlığının ortalama altı ile sekiz katı kadar yük binmektedir. Sinoviyal eklem makroskopik olarak incelendiğinde düz, parlak ve deformasyona dirençli bir yüzey görüntüsü vermektedir. Işık mikroskopunda ise daha çok hücrelerarası (ekstraselüler) ağdan oluşan, tek tip hücre içeren, kan ve lenf damarları ile sinir uçlarının bulunmadığı bir yapı gözlenmektedir. Kemik ve kas dokusuyla karşılaştırıldığında, daha düşük metabolik aktivitesi olan ve yaralanmaya sınırlı yanıt veren bir dokudur. Eklem kıkırdağının biyolojisi ayrıntılı incelendiğinde doku devamlılığını sağlamaya yönelik dinamik doku içi etkileşimlerin olduğu karmaşık bir yapı karşımıza çıkmaktadır. Diğer bağ dokularında olduğu gibi kıkırdak da hücreler, sıvı ve makromoleküler ağdan oluşmakta ve mekanik özelliklerini ağırlıklı olarak ağın yapısından almaktadır. İnsan kıkırdağında hücreler dokunun yalnızca %1'ini oluşturmaktadır. Kendisini yenileme yeteneğinin sınırlı olmasına karşın eklem kıkırdağı bu işlevini insanda uzun yıllar boyunca kusursuz sürdürmektedir.

Eklem kıkırdağı kondrositlerden oluşan tek tip hücre içermektedir. Kondrositlerin etrafı ağla çevrilidir. Erişkinlerde kondrositler sinovyal sıvıdan beslenmektedir. Diğer

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

dokulara oranla kıkırdak dokusuna daha düşük yoğunlukta oksijen ulaşmaktadır. Bu nedenle kıkırdak hücreleri öncelikli olarak anaerobik metabolik yolları kullanmaktadır. Kondrositlerin yapısı ve işlevleri kişinin yaşına göre değişmektedir. Gelişme çağında kondrositler çoğalarak yeni doku oluşturmakta ve şekillendirmektedir. Erişkinlerdeyse kondrositler dokunun hacmini değiştirmemekte, ancak yıkılan ağın makromoleküllerini yenileyebilmektedirler. İskelet sistemi gelişimi tamamlandıktan sonra, kondrositler çoğalmamaktadır. Kıkırdağa binen yükün sıklığı ve yoğunluğu kondrosit metabolizmasını etkilemektedir. Hareketsizlikle yıkım artmakta ve proteoglikan sentezi azalmaktadır (ÜZÜMCÜGİL, 2001). Yaşlanmayla birlikte kondrosit metabolizması değişerek hücrelerin proteoglikan sentezleme kapasiteleri ve büyüme faktörlerine yanıtları azalmaktadır. Bu nedenle yaşlı eklem kıkırdağında doku yenilenmesi zorlaşmaktadır. Bu da dejeneratif artrit gelişme olasılığını arttırmaktadır.

Eklem kıkırdağının ağ yapısı doku sıvısı ve makromoleküler iskeletten oluşmaktadır. Bu iki bileşen arasındaki etkileşim dokunun mekanik özelliklerini belirlemektedir. Su, eklem kıkırdağının yaş ağırlığının % 80'ini oluşturmaktadır. Makromoleküler iskelette kollajenler (başlıca tip-2), proteoglikanlar ve kollagen olamyan porteinler yer almaktadır. Fibriler kollagen ağ kıkırdağa gerilme kuvvetlerine karşı dayanma özelliğini vermektedir. Kollagen olamyan proteinlerse makromoleküler iskeletin düzenlenmesinden ve kondrositlerin iskelete bağlanmasından sorumludurlar. Proteoglikanlar ağın mekanik özellikleri açısından önemlidir.

Ağla kondrositler arasındaki etkileşim yaşam boyunca dokunun sürekliliğini sağlayabilmesi açısından önemlidir. Bu ilişki kondrositin ağı sentezlemesiyle sona ermemektedir. Olağan eklem hareketleri sırasında ağ, kondrositleri mekanik yaralanmadan koruyarak fenotipin sürdürmesini sağlamaktadır. Besinler, makromolekül sentezinde kullanılan maddeler, yıkılan moleküller ve yıkım ürünleri, büyüme faktörleri ve sitokinler ağ içinden taşınmakta veya gerektiğinde burada depolanmaktadır. Yaşamları boyunca kondrositler ağ moleküllerini sentezler ve yıkarlar. Anabolik aktivite daha çok mekanik yüklenmeler sonucunda, katabolik aktiviteyse daha çok dokuda bir takım otokrin moleküllerin salınmasıyla artmaktadır.

Ağın kondrositler için uyarı oluşturma özelliği bulunmaktadır. Eklem yüzeyindeki mekanik değişiklikler ağ tarafından kondrosite iletilmekte ve kondrositler ağ sentezini yönlendirebilmektedir. Deneysel çalışmalar süregelen anormal yüklenmelerin veya hareketsizliğin proteoglikan yapımında azalmaya yol açtığını ve bu nedenle dokunun mekanik özelliklerinin değiştiğini göstermektedir. Ekleme etki eden yüklerin düzelmesiyle ağ yapısının normale döndüğü bilinmektedir. Yüklenme, ağın moleküler yapısının düzenlenmesinde kalıcı değişikliklere de neden olabilmektedir. Sürekli yüklenmelere karşın kondrositler ağ yapımı yanıtını değiştirebilmektedirler. Diğer bir değişle ağ sadece uyarıları kondrosite iletmekle kalmamakta, aynı zamanda dokunun yüklenme süresini kaydederek doku yanıtının değişmesine neden olabilmektedir.

Eklem kıkırdağının yaralanması ve onarılması sırasında birçok büyüme faktörü ve sitokin uyarılmaktadır. Artritlik eklem kıkırdağında IGF-I yapımına ve reseptör oluşumunda artışa karşın, egzojen IGF-I e karşı yanıt azalmaktadır. Artritlik kıkırdağda IL-6 yapımı artmaktadır. Aynı zamanda matriks yıkımının mediatörleri olan IL-1 ve TNF de bu moleküllerin

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

yapımını uyarmaktadır. IL-1 ve TNF inflamatuvar artritte sinoviyadan salınmakta ve kıkırdak katabolizmasını uyarmaktadır. Aynı moleküller kondrositlerden salınarak matriks yıkımını uyarmaktadır. Bununla birlikte IL-6, IL-1 nedeniyle oluşan kıkırdak yıkımını antagonize ederek aynı zamanda onarım sürecini de başlatmaktadır. Eklem kıkırdağının mekanik yüklenmesi de IL-6 yapımını uyarmakta ve bu sitokin de ağın metabolik yanıtını düzenlemektedir.

Kıkırdak dokusu yaşam boyunca yıkılan makromolekülleri sentezleyerek kendi kendini yenilemektedir. Normal ağ dönüşümü, kondrositlerin makromoleküler iskeletteki değişiklikleri algılayarak uygun tipte ve miktarda yeni molekül sentezlemesiyle olmaktadır. Ağ ayrıca bir sinyal iletici gibi rol oynamaktadır. Eklem kullanılmasıyla oluşan yüklenme mekanik, elektrik ve fizikokimyasal sinyaller meydana getirerek kondrositlerin aktivitelerini yönlendirmektedir. Eklem kullanımındaki süregelen azalma ağ içeriğinde azalmaya ve mekanik özelliklerin değişmesine neden olurken, eklem düzenli kullanımı kıkırdağın sentetik işlevlerinde artmaya ve dokunun yenilenmesine neden olmaktadır. Yaşlanma, ağ içeriğinin değişmesine ve kondrositlerin büyüme faktörlerine yanıtının azalmasına neden olmaktadır. Bu değişimler de kıkırdak dejenerasyonunda artmaya neden olabilmektedir.

Eklem kıkırdağının kendini yeterince onaramadığı bilindiğinden birçok araştırmacı tarafından kıkırdak iyileşmesi yoğun olarak çalışılmaktadır. Diğer dokularla karşılaştırıldığında eklem kıkırdağının hücre-ağ oranı ve mitotik aktivitesi oldukça düşüktür. Erişkin eklem kıkırdağı kayıpları genel olarak iki tiptir. Bunlardan tam kat olarak adlandırılan ve subkondral kemiğe kadar uzanan tipi fibröz kıkırdak ile iyileşebilmektedir. Bu durumda normalde kan damarı olmayan kıkırdağa, subkondral kanama yoluyla bir takım öncül hücreler ve büyüme faktörleri göç edebilmektedir. Subkondral kemiğe uzanmayan yüzeysel kayıplardaysa iyileşme, daha kalitesiz fibröz bir doku ile sonuçlanmaktadır. Fibröz kıkırdakla iyileşen bu onarım dokuları, eklem binen yüke karşı hiyalin tipteki eklem kıkırdağı kadar dayanıklılık gösterememektedir.

Eklem kıkırdağının iyileşmesindeki sorunlar araştırmacıları, mekanik ve biyolojik olarak orijinal eklem kıkırdağı kalitesinde bir doku elde etmeye yöneltmiştir. Bu amaçla mikrokirik, abrazyon artroplastisi, allojen ve otojen (mozaikplasti) greftleme gibi teknikler günümüzde kullanılmaktadır. Bunların sonucunda da yaygın olarak onarım dokusu oluşmaktadır. Ancak oluşan onarım dokusu arzulan orijinal eklem kıkırdağı kalitesinde değildir. Bu yöntemlerle daha çok düzensiz tip-1 kollajen içeren ve çevre doku ile uyumu iyi olmayan bir yapıya ulaşılabilirdiği gözlenmektedir.

Yapay doku veya organ çalışmalarında kolay elde edilebilen ve üretilebilen hücreler tercih edilmekle birlikte eklem kıkırdağı gibi özel işlevi olan dokularda o dokunun eşdeğerinin üretilebilmesi önem kazanmaktadır. Eklem kıkırdağında oluşan yaralanma orijinal dokuyla iyileşmediğinden bu tür yaralanmalarda erken doku hasarı gelişmekte ve birey açısından olduğu kadar toplumsal boyutuyla da önemli bir sağlık sorununa dönüşmektedir. Günümüzde yapay ortamda üretilen kıkırdak hücreleri yeniden insana uygulanarak kıkırdak yaralanmaları tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Bu yöntem Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) de *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

onaylanmış ve yılda ortalama 2.000 hastada uygulama alanı bulmaktadır. Buna rağmen önerilen yöntemin belirgin sorunları vardır. Bunların başında üretilen hücrelerde farklılaşma, beklenen hücrelerarası ağın gelişmemesi ve özellikle uygulama alanından hızla kaybolma gibi sorunlar karşımıza çıkmaktadır.

Tek başına kondrosit hücrelerinin transplantasyonundan bir sonraki aşama ideal hücre yoğunluğunda, üç boyutlu, biyolojik olarak eriyebilen ağlarla kondrositleri birleştirerek orijinal yapı ve işleve eş kıkırdak dokusunu geliştirebilmektir.

Çeşitli moleküllerin, hücrelerin, doku veya organların laboratuvar ortamında geliştirilmesi yada değiştirilerek edilmesi sonucunda insan vücudundaki yaralanmış ya da hastalıklı dokuların fonksiyonlarını sürdürebilmeleri amacı ile kullanılması, kabaca doku mühendisliğinin ana konusunu oluşturmaktadır. Bu tanımdan da anlaşılacağı gibi doku mühendisliği çok geniş bir alanı kapsamaktadır. Bu alanın bir ucunda çok basit olarak bir hücrenin laboratuvar ortamında üretilmesi yani hücre kültürü yer alırken, diğer ucunda dokuların, organların üretilmesi ve kullanımı yer almaktadır.

Günümüz toplumunda spor yapan bireylerin artması ve ortalama yaşam süresinin uzaması eklem kıkırdağı yaralanmalarının ve dejenerasyon hastalıklarının artmasına neden olmuştur. Ülkemizde sayısal veriler bilinmemekle birlikte Amerika Birleşik Devletleri'nde eklem kıkırdağı hastalıklarıyla ilgili yıllık harcamanın 8 milyar dolar dolayında gerçekleştiği bildirilmektedir (JACKSON, 1999).

Kıkırdak dokusunda yaralanma sonrası oluşan enflamatuar yanıt diğer dokulardan oldukça farklıdır. Bunun en önemli nedeni kıkırdak dokusunun avasküler olmasıdır (MANKIN, 1982). Enflamatuar yanıtın ikinci ve üçüncü fazları vasküler sistem tarafından yönlendirilir. Kıkırdak dokusunda iyileşmenin bu son iki fazı gerçekleşmemektedir. Kıkırdak dokusu ayrıca pıhtı oluşumuna, damar ve makrofaj invazyonuna karşı inhibitör maddeler içerir (MANKIN, 1982). Kıkırdak iyileşmesini güçleştiren bu faktörlerin yanında kollagen ve proteoglikan ağ içerisinde yer alan kondrositlerin yaralanma olan bölgeye göç etme yeteneklerinin olmaması da diğer bir dezavantajdır. Kıkırdak dokusundaki yaralanmanın subkondral bölgeye uzandığı ve vasküler sistemin de sürece katkıda bulunduğu durumlarda enflamatuar yanıt farklı gelişmektedir. Bu bilgiler göz önüne alındığında subkondral bölgeye uzanan ya da uzanmayan kıkırdak yaralanmalarının iyileşme süreçlerinin de farklı olması beklenmektedir (NEWMAN, 1998).

Kıkırdak kayıplarının tedavisinde hücre, gen tedavisi yada büyüme faktörlerinden hangisi kullanılırsa kullanılsın, iskeleti oluşturacak bir ağa gereksinim duyulmaktadır (HUNZIKER, 1996). Bölgesel kıkırdak dokusu kayıplarında ağın olmadığı durumlarda iyileşmeyi sağlayacak maddeler yaralı bölgeye verilse de iyileşme olmamaktadır (HUNZIKER, 1996). Uygun ağ yapısının seçilmesi tedavinin başarısındaki en önemli etkenlerden birisidir.

Polimer yapı iskeletleri doku tamir süreci içerisinde başlangıçta mekanik sağlamlık ve hücrelerin tutunabileceği bir ortam sağlarlar. Bu polimerlerin hücrelerle olan uyumu doku

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

mühendisliğini başarısında önemli rol oynar. Dokularda yapı iskeleti olarak pek çok biyoçözünür madde kullanılmaktadır. Bu maddelerin çözünürlüğü günler ile aylar arasında değişmektedir. Poliglikolik asit, polilaktik asit, polikarpolakton, polietilenglikol ve doğal polimerler olan kollagen ve hyaluronik asit günümüzde kıkırdak doku mühendisliğinde yaygın kullanılan polimerlerdir.

İdeal ağı tasarlamak ve üretmek için göz önüne alınması gereken önemli etmenler bulunmaktadır. Ağın gözenek yapısı uygulanacağı dokudaki hücrelerin geçişine izin vermelidir. Kıkırdak dokusunun iyileşmesini örneklemek amacıyla büyüme faktörleri kullanılırsa bu faktörler ağ üzerine yerleştirilebilmelidir. Ağ, hücrelerin üzerine tutunmalarına izin vermelidir. Kullanılan ağ biyolojik ortamda zaman içerisinde yerini orijinal dokuya bırakabilmelidir. Ağ biyolojik ortamdaki yaralı bölgede iyileşme süreci içerisinde hacimini koruyabilmelidir. Yaralı bölgeye konulduğunda çevre kıkırdak dokusuyla uyumlu olmalıdır.

Otolog kıkırdak hücre implantasyonu; hastadan sağlam kıkırdağın alınması, hücrelerin laboratuvar ortamında çoğaltılması ve daha yoğun olarak defektli bölgeye geri verilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem doku mühendisliğinin bugün için klinik kullanım alanı bulmuş ve halen uygulanmakta olan tedavi yöntemlerinden birisidir (BRITTBERG, 1999). Bu yöntemde kullanılan hücre tipi kondrositlerdir. Kondrositler yalnız başlarına (GLIMCHER, 1993), kollagen yapı iskeletleri (BEN-YISHAY, 1995), kollagen jel (WAKITANI, 1989) ve fibrin pıhtısıyla birlikte (HUNZIKER, 1996) kıkırdak lezyonlu bölgeye uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Mezenşimal kök hücreleri içerisinde kas (HENDRICKSON, 1994), periost (O'DRISCOLL, 1986) ve kemik iliği kökenli (WAKITANI, 1994) kök hücrelerinin kullanımları bildirilmiştir. Bu hücreler buldukları ortamın oluşturacağı doku yanıtının etkisiyle kondrositlere dönüşmekte ve kıkırdak dokusunda rejenerasyon sürecini başlatmaktadır.

Büyüme faktörleri hücre bölünmesinde, farklanmasında, göçünde ve ağ üretiminde etkili olan polipeptid yapılarıdır (COUTTS, 1997). Büyüme faktörlerinin bir bölümünün kıkırdak metabolizmasında ve kondrogenesiste etkin rol aldığı gösterilmiştir (COUTTS, 1997). Osteokondral yaralanmalar, eklem dejenerasyonu, subkondral drilizasyon, greftleme gibi cerrahi girişimler bu faktörlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (BUCKWALTER, 1998). Kıkırdak dokusu üzerinde etkili olan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), kemik morfojenik protein (BMP), hepatosit büyüme faktörü (HGF), fibrblast büyüme faktörü (FGF) ve transforming büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ )'dır:

Büyüme faktörlerinin doku ve hücreler üzerindeki etkileri araştırılmış olmakla birlikte bu faktörlerin doz bağımlı etkileri olduğu bilinmektedir. Büyüme faktörleri, etkili olduğu hücrenin gelişim evresi, dokunun yaşı, yaralanmanın süresi gibi pek çok etkene bağlı olarak farklı yanıtlar oluşturabilmektedir. Kıkırdak yaralanmalarının tedavisinde gerek büyüme faktörleri, gerekse hücreleri yaralı bölgeye taşınmalı ve iyileşmeyi gerçekleştirecekleri sürece ortamda kalmalıdır. Büyüme faktörlerinin *in vivo* yarı ömrü ve degradasyon süreleri çok

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

kıtsadır. Büyüme faktörlerini eklem içerisine taşıyan yöntemler arasında multiple enjeksiyonlar, implante pompalar, bu faktörleri taşıyan sentetik ağlar ve gen transferi sayılabilir. Sentetik ağlar hem taşıyıcı olarak hem de kıkırdak yüzeyin onarılmasında işlev görürler (BUCKWALTER, 1998). Günümüzde büyüme faktörleri açısından taşıyıcı sistem olarak geniş kabul görmüş bir sentetik ağ henüz üretilmemiştir. Sentetik ağ ve taşıyıcı sistemlerin bazıları büyüme faktörlerini başarı ile taşıırken yaralı bölgeye hücre göçünü engelleyebilmektedir (O'CONNOR, 2000).

## Literatür Özeti:

Eklem kıkırdağı elastik yapıda yük taşıyan bir dokudur. Bu doku eklem sıvısıyla birlikte hareket için gerekli olan sürtünme (frikasyon), kayma (lubrikasyon) ve aşınmayı engelleyici özellik gösterir. Aksiyel mekanik yük ve şok dalgaları kıkırdak tarafından belirli oranlarda soğurulur. Ekleme gelen yük, subkondral kemik gibi destekleyici yapılara kıkırdak aracılığıyla eşit dağıtılır. Fizyolojik koşullarda eklem kıkırdağı, bu önemli biyomekanik işlevini çok az hasarla yedi veya sekizinci dekatlara kadar yerine getirebilmektedir. Kıkırdak dokusu travma veya kronik ve ilerleyici dejeneratif eklem hastalıklarında hasara uğrayabilir. Eklem kıkırdağı metabolik olarak aktif bir doku olmasına rağmen, çok sınırlı tamir yeteneğine sahiptir. Travma veya dejeneratif hastalıklar, eklemlerde kalıcı veya ilerleyici yaralanmalara yol açarak kıkırdak yıkımına, dolayısıyla eklem yüzeyinde kayba neden olmaktadır (BEHRAVESH , 1999; BRITTBURG, 1996; BUCKWALTER, 1997).

Her yıl çok sayıda insanda farklı nedenlerle oluşan travmalar (trafik kazaları, yüksekten düşme, deprem gibi felaketler, spor yaralanmaları vb.) kıkırdak dokusunda yaralanmalara yol açmakta ve bu önemli derecede iş gücü kaybı ve yüksek tedavi masraflarına neden olmaktadır. Sınırlı iyileşme uyarısı üretebilme özelliği gösteren kıkırdak hücreleri normal doku iyileşmesini sağlayamamakta ve fizyolojik işlev yerine getirilememektedir. Günümüzde uygulanan koruyucu veya girişimsel tedavi yöntemleri orijinal doku yerine tamir dokusunun oluşmasına neden olmakta ve yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kıkırdak doku yaralanmalarında gelişmiş tedavi yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Tamir edilen kıkırdağın doku olarak yeterli işlev görebilmesi için hücre ve hücrelerarası yapısının, mekanik özelliğinin, sağlamlık ve dayanıklılığının doğal yapıya eş olması hedeflenmektedir (ÖZKAN, 1999).

Eklem kıkırdağının yapısı, metabolizması ve biyomekanik özellikleri son yıllarda gerçekleştirilen kapsamlı çalışmalarla büyük oranda anlaşılmıştır. Bunun sonucunda eklem yaralanmalarında ve dejeneratif eklem hastalıklarının tedavisinde prostetik eklem replasmanlarına seçenek olarak biyolojik girişimler ön plana çıkmaktadır (GIRDLER, 1995; MOW, 1999; SHORTKROFF, 1996). Günümüzde yaygın kullanım alanı bulan prostetik eklem cerrahisinin yerini (Sadece ABD de yılda 400.000'in üzerinde kalça ve 200.000'in üzerinde diz eklemi replasmanı gerçekleştirilmektedir) büyük oranda biyolojik replasmanın alması (2030 yılında bu oranın %50'ye ulaşması) beklenmektedir. Biyolojik replasmanla hedeflenen, kültür ortamında yetiştirilen ve çoğaltılan orijinal kıkırdak hücrelerinin yapay hücrelerarası matriks ile birleştirilerek normal doku özelliğini edinebilmektir. Son yıllarda doku kültürlerindeki hücrelerin büyüme ve farklanmasını sağlayan çevre koşulları hakkındaki

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

## TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

bilgilerimizin artması, kıkırdak hücreleri (kondrositler) ve mezaşimal hücrelerin implantasyonu yoluyla kıkırdak tamirinin uyarılmasına yönelik çalışmalar bu hedefe yaklaşılmakta olduğunu göstermektedir (GRANDE, 1999; KAWAMURA, 1998).

Düşük immünojenik yükü ve canlılığının kaybetmeden korunabilmesi nedeniyle kültür ortamında kıkırdak hücrelerin üretilmesi ve canlıya uyarlanması tavşan modelinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu hücrelerin farklı taşıyıcılarla dokuya aktarılması çalışmalarına başlanmıştır. Wakitani ve arkadaşları (1989) 24 haftalık gözlem sonuçlarında, tavşan diz eklemlerindeki osteokondral defektleri kollajen jel içine gömülmüş allojenik kondrositlerle tedavi etmiş ve hiyalin kıkırdak oluşumu göstermiştir. Çalışmalarında, kıkırdak doku defektlerinin hiyalin kıkırdakla dolu görünmesine rağmen, histolojik yönden değerlendirildiğinde, belirgin subkondral kemik oluşumuna rastlanmamıştır. Histolojik olarak mononükleer hücre infiltrasyonu saptamamış ve transplante edilen kondrositler veya kollajen tarafından immunolojik reaksiyonun görülmediğini bildirilmiştir. Buna karşılık erken dönemde (iki veya dördüncü haftalarda), izojenik veya allojenik kondrositlerle tedavi edilen defektlerin hiyalin kıkırdak ile dolduğu, perifer kısımlarda ise allojenik defektlerde daha belirgin olmak üzere hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonunun varlığı bildirilmiştir. Tavuk diz eklemine oluşturulan osteokondral defektler, fibrin yapıştırıcı içine gömülen allojenik epifizyel kondrositlerin transplantasyonu ile tamir edilmiş ve hiyalin kıkırdak oluşumu gösterilmiştir. Altı ay sonundaki gözlemlerde yüzeyde yeni oluşan dokunun, normal hiyalin doku olduğu ve derin bölgelerde de trabeküler kemik oluşumu vurgulanmıştır.

Mikroçevre koşullarındaki farklılıklar transplante kondrositlerdeki gelişmenin iki fazda olduğunu göstermektedir. Yüzeysel bölgeye transplante edilen ve sinovyal sıvı ile beslenen hücrelerde hiyalin kıkırdak gelişmekte, ancak derin bölgelere transplante edilen ve kan yoluyla beslenen hücrelerde ise kemik oluşmaktadır (HUNZİKER, 1999). İyileşmedeki başarı oranları önerilen yöntemlerle oldukça yüksek bulunmaktadır.

İlk olarak Brittberg ve ark.'nın (1996) 23 hastanın patellası veya femur kondilindeki yerel kıkırdak defektlerinin tedavisi için ACT kullanımını araştırmışlardır. Kondrositler hastalardan alındıktan sonra 14 ila 21 gün kültürde çoğaltılmış, defektli bölgeye enjekte edilmiş ve periost flebi ile örtülmüştür. Transplantasyondan 2 yıl sonra kondiler defekti olan 16 hastanın 14'ünde ve patellar defekti olan 7 hastanın 2'sinde iyi veya çok iyi klinik sonuçlar bildirilmiştir. Bir patellar ve 11 femoral defekten alınan biopsilerde hiyalin kıkırdak gösterilmiştir. Aynı grup son olarak daha geniş bir hasta grubu ile ilgili sonuçlarını yayınlamışlardır. Dizdeki kondral ve osteokondral defektlerin kondrosit transplantasyonu ile tedavisinden 2 veya daha uzun süreli takiplerde 66 hastanın 47'sinde işlevin arttığı gösterilmiştir (BRITTBERG, 1996).

Bu sonuçlar bize periosteal greftlerle beraber kondrositlerin transplantasyonunun insanlarda eklem yüzeyinin yeniden yapılanmasını arttırdığını göstermektedir. Buna rağmen fonksiyonların ve bu oluşan yeni dokunun tanımlanması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Bu konuda *Genzyme* (Cambridge, MA, ABD) şirketi Carticel® adıyla kullanıma sunulan otolog kondrosit kültürü uygulamalarına ticari olarak başlamıştır.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

Yapılan çalışmalarda kondrositlerin defekt alanında tutulmasındaki zorluklar, iki aşamalı cerrahi girişim (birisini otolog kıkırdak hücrelerini almak için diğeri kültürde çoğaltılan hücreleri defekte uygulamak ve üzerini periost dokusuyla kapatmak için), kondrositlerin belirli bir süre sonra fibroblastik farklanmaya uğraması ve fenotipik özelliklerini değiştirmesi nedeniyle bu hücrelerin doğal ortamlarına yakın özellikler gösteren doku mühendisliği ürünü matriks yapılarının geliştirilmesine gereksinim duyulmuştur.

Yapılan çalışmalar üçüncül kültürlerde kondrositlerin Tip II kollajen yerine Tip I kollajeni ürettiği göstermektedir (PUELACHER, 1994; SUSANTE, 1995). Bu hücreler üç boyutlu matrikse alındıklarında tekrar eski hallerine dönmekte ve Tip II kollajen üretebilmektedirler. Bu nedenle kondrositlerin üç boyutlu matriksler veya taşıyıcı sistemler üzerinde aktarılması zorunlu görülmektedir (BEHRAVESH, 1999).

Doku mühendisliği, biyopsi yoluyla elde edilen dokudan canlı hücrelerin ayrıştırılması, sayısının *in vitro* olarak çoğaltılması ve bunların yaşamsal koşullarını sağlayacak ideal ağlar üzerine aktarılmasını içeren disiplinlerarası bir uygulama alanıdır (MOW, 1999; LANGER, 1993; MA, 1995; MESSNER, 1996; SCHREIBER, 1999; VACANTI, 1995; VUNJAK-NOVAKOVIC, 1999). Bu yöntemle biyolojik veya sentetik malzemelerle hücreler birlikte kullanılarak fonksiyonel doku replasmanların gerçekleştirilmektedir (CAO, 1997).

Yeni doku üretilmesinin başlıca 3 genel stratejisi vardır:

1. Yalnızca izole edilen hücrelerin veya ürünlerinin replasmanı,
2. Büyüme faktörleri gibi doku uyarıcı yapıların yaralı alana taşınması veya o bölgede üretilmesi,
3. Doğal (kollajen) veya sentetik (polimer) yapılardan hazırlanan ağ içine veya üzerine hücrelerin yerleştirilmesi ve hasarlı alana uygulanması.

Kıkırdak dokusu yalnız bir tip hücre (kondrosit) içermesi nedeniyle doku mühendisliği için ideal bir doku olarak görülmektedir. Kondrositler;

- Kıkırdak dokudaki tek hücre tipidir.
- *In vitro* olarak kolayca çoğaltılabilirler.
- Uygun ortamda (-80°C veya sıvı azot) saklanabilirler.
- Uzun süre canlılıklarını koruyabilirler.
- Çok düşük oksijen gereksinimi içindedirler.
- Difüzyon ile beslenebilirler.

Bu özellikleri nedeniyle kıkırdak hücreleri doku mühendisliği için uygun bir hücre tipidir.

Kıkırdak doku mühendisliğindeki ilk aşama sağlıklı kondrositlerin elde edilmesidir. Biyopsi veya deney hayvanlarından alınan ufak miktardaki kıkırdak doku parçaları taşıma çözümleri içinde laboratuvara getirilir. Daha sonra bu parçalara mekanik ve enzimatik ayrıştırma işlemi uygulanır. Ayrıştırılan hücreler *in vitro* ortamda tek katlı hücre (*monolayer*)

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

sisteminde üremeye bırakılır. Alt kültür (*subculture*) yöntemleriyle hücrelerin sayıları artırılır. Bu işlemler % 5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörlerde 37°C de gerçekleştirilir. İleri aşamalarda kullanılacak hücreler uygun soğukluklarda saklanabilir veya laboratuvar dışına taşınabilir.

İkinci önemli aşama kondrositlerin üzerinde yaşayacağı ağ yapılarının üretilmesidir. Ağın biyolojik uyumluluğu (toksik olamaması, düşük antijenitesi, düşük doku yanıtı) ve hücre ile etkileşimi (bir çok hücre tipini bağlayabilmesi, metabolizmayı koruyabilmesi, çoğalmaya izin vermesi) araştırılması ve geliştirilmesi gereken başlıca özelliklerdir (YAYLAOGLU, 1999). İdeal bir ağın geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken özellikler aşağıda verilmektedir. Bunlar;

- Optimal fibril çapı.
- Kimyasal kompozisyon.
- Fibriller arası uzaklık.
- Özel şekillere dönüştürülebilirlik.
- Gözeneklilik.
- Yüzey alanı ve yüzey özellikleri.
- Kullanılabilirlik
- Yapı bütünlüğü (integritesi) şeklinde sıralanabilir.

Kıkırdak doku tamirinde kondrositlerin izole edilerek, doku kültürü teknikleriyle *in vitro* olarak çoğaltılması ve yeterli hücre sayısı elde edilince taşıyıcı yapay bir ağa yüklenerek yaralanma bölgesine yerleştirilmesi planlanmıştır. Taşıyıcı yapay ağlar genelde zaman içinde yıkılmaktadır. Bu arada kondrositler, kendi matrikslerini sentezleyerek uygun yapıda bir iyileşme dokusu oluşturabilmektedirler. Kondrositler biyolojik uyumlu (*biocompatible*), eriyebilen (*biodegradable*) üç boyutlu ağlar üzerine aktarılarak Petri kaplarında, dönen flasklarda veya bioreaktörler içinde kültür işlemine tabi tutulur ve yapay kıkırdak doku oluşturulur (PUELACHER, 1994). Hücre içeren bu ağlara daha sonra şekil verilerek alıcı alana uygulanır (FREED, 1994). Bu sayede elde edilen doku mühendisliği ürünü yapılar *in vivo* olarak eklem kıkırdağının onarımında kullanılır.

Kıkırdak dokusunu *in vitro* olarak etkileyen bazı faktörler vardır. Bunlar: (a) medium içeriği, (b) hücre yoğunluğu, (c) mekanik yüklenme ve (d) kıkırdak dokunun alındığı örneğin yaşıyla değişmektedir.

a. Medium İçeriği: Doku kültürü uygulamalarında kullanılmakta olan çok farklı mediumlar ticari olarak bulunmaktadır. Kondrosit hücre kültürü yapmak için mediumun belli bazı özelliklere sahip olması gerekir. Medium uygun oranlarda inorganik tuz, amino asit, vitaminler ve besleyiciler içermelidir. Mediumda bulunan D-glukoz ve Na-piruvat enerji kaynağıdır. Eklenen glutamin de aynı görevi üstlenir. Kondrositlerin büyümesini ve çoğalmasını hızlandıracak faktörler içeren serumlar da ortama ayrıca eklenmelidir. Bu amaçla genellikle %10 hacimde fetal dana serumu kullanılmaktadır. Kollajen yapısında bulunan prolin de media eklenir. Askorbik asit, nedeni tam bilinmemekle birlikte kıkırdak doku kültürlerine eklenmesi önerilen maddelerdendir (50 µg-ml). Bu maddelerin çoğunu içeren

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

ticari formlar vardır. Bunlardan D MEM (Dulbecco's modified eagle medium) en güncel olanıdır.

b. Hücre Yoğunluğu: Bu konuyla ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Ancak, Brittberg ve arkadaşları, tavşanlarda yaptıkları deneysel çalışmada mililitrede 6 milyon hücreyi önermektedirler (BRITBERG, 1996). Buna karşın Athanasiou ve arkadaşları 10 milyonun altındaki hücre yoğunluğu ile oluşan kıkırdak dokusunun yetersiz olduğunu ileri sürmüşlerdir (BRITBERG, 1996). Hücre yoğunluğu arttıkça oluşan yapay kıkırdak dokusu daha homojen ve orjinaline daha yakın olmaktadır. Kondrositler üç boyutlu matrikse ekildiğinde, hücrelerin tümü yapışmamaktadır. Bu nedenle, hücre yoğunluğunun mümkün olduğunca fazla olması gerektiği öne sürülmektedir. Sonuç olarak, yapay kıkırdak oluştururken hücre yoğunluğunun mililitrede 10 milyon hatta 20 milyon üzerinde olması arzulanmaktadır.

c. Mekanik Yüklenme: Canlılarda eklem kıkırdağı oluşumu mekanik uyarı ile olasıdır. Bu nedenle, araştırmacılar *in vitro* eklem kıkırdağının oluşumunda mekanik etkileri incelemiştir. Mekanik uyarılar bulunduğu mikroçevreyi değiştirerek hücrenin fonksiyonlarını etkilemektedir. Kondrositlerin matrikse fokal adezyonlarla tutunduğu gösterilmiştir. Adezyon molekülleri sadece mekanik olarak hücre tutunmasına değil, aynı zamanda mikroçevredeki değişiklikleri algılayan reseptör görevi de görürler. Adezyon moleküllerinin yapay matrikse yatkınlığını artırmak için fibronektin gibi bir protein molekülüyle kaplanabilir. Bu durumda adezyon molekülleri hücre omurgasını oluşturan aktin iskeletini doğrudan protein kaplı matrikse bağlar. Bir başka açıdan bakılacak olursa mekanik uyarının kıkırdak içindeki hücre aktivitelerinde büyük önemi vardır çünkü kıkırdak, kan ile lenfatik dolaşım ve nöral dokudan yoksun olduğundan, hücreler mekanik uyarı dışında hiçbir uyarı alamamaktadır. Yapay kıkırdak dokusu rotasyonel hareket yapan bir sistemin içine konulduğunda oluşan dokunun statik sistemlerde geliştirilen dokudan daha homojen, proteoglikan içeriği daha fazla olan bir doku elde edilir. Statik kültür proteoglikan sentezinin daha kötü olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle mekanik parametrelerin değiştirilebildiği bioreaktörler kıkırdak mühendisliği için en uygun ortamlardır. Freed ve arkadaşları kıkırdağa mekanik etkilere değişik bir bakış açısı getirerek, yer çekimsiz ortamın kıkırdağa etkilerini incelemiştir (FREED, 1994). Bu çalışmalar uzayda uzun süre yer çekiminden yoksun ortamda çalışan astronotların eklem kıkırdaklarında gelişebilecek değişiklikleri ortaya koymak için yapılmıştır. Mir uzay üssünde gerçek yer çekimsiz ortamda ve yerdeki uzay laboratuvarlarında yapılan çalışmaların sonuçları benzerdir. Kondrositlerin ekildiği üç boyutlu matriksler yer çekimsiz ortama maruz bırakıldığında, ekstraselüler matrikste proteoglikan oluşumunun yetersiz olduğu saptanmıştır. Yani, yerçekimi de kıkırdak dokusu üzerinde etkili mekanik bir parametredir.

d. Kıkırdak dokusunun alındığı örneğin yaşı: Otolog kondrosit implantasyonunun klinik uygulamaları arttıkça yeni bir sorun karşımıza çıkmaktadır. Kondrosit implantasyonu yapılacak hastanın yaşı bazı durumlarda sorun oluşturabilmektedir. Harrison ve arkadaşları yaptıkları klinik bir çalışmada, değişik yaş gruplarından kıkırdak biyopsisi almışlar ve doku kültüründe hücrelerin çoğalma hızlarını değerlendirmişlerdir (HARRISON, 1991). Buna göre 50 yaş üstü gruptan alınan hücre kültürlerinde 50 yaş altı gruba göre birinci pasajı alma süresi 3 gün daha uzun sürmüştür. Ancak, ikinci pasaj sürelerinde bir fark görülmemiştir. Bu

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

nedenle otolog kıkırdak transplantasyonunun yaşlı hasta grubuna da uygulanabileceğini ileri sürülmüştür.

Kıkırdak doku mühendisliğinde amaç, eklem kıkırdağına biyomekanik ve biyokimyasal olarak benzer dokuyu elde etmektir. Kıkırdak dokusu mekanik özelliklerini ekstraselüler matriksten alır. Yapay ağlar bir yandan hücrelerin stabilitesini sağlarken, öte yandan mekanik olarak orjinal matriksi taklit etmeli ve bozunurken yeni matriks oluşumunu engellememelidir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan yapay ağlar (a) polimer kökenli yapay ağlar ve (b) doğal polimer ağlar olarak ikiye ayrılırlar.

a. Polimer Kökenli Yapay Ağlar: Sentetik polimerler özellikle ortopedik cerrahide tespit ve dikiş malzemesi olarak güvenle kullanılmaktadır. Kıkırdak doku mühendisliğinde de hücrelerin yerleştirildiği üç boyutlu ağı oluşturmak için çok değişik sentetik polimerler üzerinde durulmuştur. Karbon lif, poliglaktolik asit (PGA), Polilaktik asit (PLA), PLA-PGA kopolimerleri, politetrafloroetilen ve polyesterler üzerinde çalışılan biyomateryallerdir. Poli  $\alpha$ -hidroksi asitler (PGA, PLA) ortopedik cerrahide oldukça yaygın klinik uygulamaları olan polimerlerdir. Biyoyumlu bu polimerler kıkırdak doku mühendisliği için yapılan deneysel çalışmalarda sıkça kullanılmışlardır. Bu grup polimerler kütleli bozunma özelliğindedirler. Polimerin molekül ağırlığına göre bozunma süresi değişir. Kütle kaybı, moleküler zincirlerin polimer ağdan dışarı rahatça difüze olmaları büyüklüğe gelene kadar başlamaz. Ortaya çıkan yıkım ürünleri asidiktir. Bu da bazen inflamatuvar yanıt oluşturur. Eğer çevre doku iyi kanlanamıyorsa ve metabolik aktivitesi düşükse geçici rahatsızlıklara neden olur. Ortopedik cerrahide uygulanan PGA çivilerin çevresinde, artan pH ile oluşan osmotik basıncın sinüs oluşumuna neden olabileceği gösterilmiştir (EDWARDS, 2001). Yıkım ürünü olarak karşılaştırıldığında, PLA'nın ürünü olan laktik asit, PGA'nın ürünü olan glikolik aside göre daha biyoyumludur. Kondrositler, 12 günlük inkübasyon süresinde 2mg/ml yoğunluktaki laktik asiti tolere edebilirler. Ancak, aynı yoğunluktaki glikolik asit hücre metabolizmasını etkiler. Her iki  $\alpha$ -hidroksi asit de normalde insan metabolizmasında bulunmaktadır. Laktik asit kaslarda glikoliz sonucu oluşur ve glukoneogenez için karaciğerde metabolize olur. Glikolik asit glisin sentezi esnasında oluşan bir metabolittir. Bunlara karşın, degradasyon ürünleri tedrici olarak salınmaz. Yukarıda söz edildiği gibi kütleli olarak yıkıma uğradıklarından aniden yüksek konsantrasyona ulaşırlar. Kondrositlerin laktik asiti daha rahat tolere edebilmelerinin nedeni, normalde de anaerobik metabolizmayı kullanmalarındadır. Glikolik asit ise hücreleri doğrudan pH'yı düşürerek etkilemez. Olasılıkla, glikolik asit oksidaz enzimi ile  $H_2O_2$  salınımını artırarak etkiler. Freed ve arkadaşları yapmış oldukları deneysel çalışmada, kısa dönemde PGA'nın poröz PLA'dan daha iyi olduğunu ifade etmişlerdir (FREED, 1994). Ancak, uzun dönemde her iki polimerin de sonuçlarının iyi olduğunu bildirmişlerdir. Kısa dönemde PLA'nın dezavantajının, PLA ağının diffüzyona yeterince izin vermemesinden kaynaklandığını savunmuşlardır. Grande ve arkadaşları (1999), yapmış oldukları *in vitro* çalışmayla, PGA ağının proteoglikan sentezini arttırdığını bildirmişlerdir. Sentetik polimerlerden oluşan ağ kullanımında bir başka tartışılmalı konu da ağın makroskopik ve mikroskopik üç boyutlu yapısıdır. Doku mühendisliğinde bozunabilir hücre taşıyıcılarının mikroskopik yapılarının optimize edilmesi önem taşır. Lifler ve poröz yapılarla birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunlar içinde dalgalı olmayanlar *in vitro* doku oluşumu için önerilmektedir.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

b. Doğal Polimer Ağlar: Doğal polimerlerin osteokondral kayıpların tedavisinde kullanılması fikri ilk kez Speer ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır (SPEER, 1979). Tavşan diz eklemlerinde oluşturulan osteokondral kayıplarda sünger formunda kollajen kullanmışlar ve tamir dokusunun orijinal eklem kıkırdağına benzer özellikler taşıdığını belirtmişlerdir. Daha sonraları kollajen, kıkırdak doku mühendisliğinde üzerinde sıkça durulan malzemelerden birisi olmuştur. Bunun dışında kollajen-hidroksiapatit kompozitleri, fibrin, hiyalüronik asit, aljinatlar, glikozaminoglikan destekli polisakkarid hidrojelleri, jelatin ve son zamanlarda da kitosan kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyopolimerlerdir.

Homminga ve arkadaşları (1993) kondrositlerin konsantre fibrin yapıştırıcı (Tissucol®) içindeki davranışlarını incelemişler ve fibrin yapıştırıcının kıkırdak transplantasyonu için uygun bir ağ olduğunu ifade etmişlerdir.

Kültüre edilmiş kondrositlerin kollajen içindeki davranışlarını ilk kez inceleyen çalışmalardan biri Wakitani ve arkadaşlarına aittir (WAKITANI, 1989). Kondrositleri altı hafta boyunca kollajen jel içinde takip etmişler ve hücrelerin ortama uyumlarının iyi olduğunu ve tip-2 kollajen, proteoglikan gibi ağ makromoleküllerini sentezleyebildiklerini göstermişlerdir. Doksanlı yılların başlarında, kıkırdak doku mühendisliğinin güncelleşmesi ile ilk akla gelen doğal polimerler, kıkırdağın doğal yapısında bulunan kollajendir. Grande ve arkadaşları (GRANDE, 1999) yapmış oldukları *in vitro* çalışmada kollajen ve diğer polimerleri karşılaştırmışlardır. Kondrositlerin, kollajen bulunan ortamda daha çok kollajen sentezlenmesini olumlu geribildirime bağlamışlardır. Proteoglikan sentezinin ise PGA ve PLA bulunan ortamda daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Çünkü, polimerler yıkıldıkça ortam pH'sı düşmüş ve bu da proteoglikan sentezini arttırmıştır. Bu nedenle hem kollajen hem de PGA yada PLA içeren kompozit ağların kullanımının daha uygun olacağı sonucuna varmışlardır.

Kawamura ve arkadaşları (1998), jel yapısındaki kollajene allojenik kondrosit ekip *in vivo* olarak değerlendirmişlerdir. Tip-1 kollajen içeren bu jelle oluşturulan yapay kıkırdak dokusunun altı aylık takip süresince eklem kıkırdağı ile aynı morfolojik özellikleri gösterdiğini bildirmişlerdir. Kawamura ve arkadaşları kondrositlerin allojen olmasının bir sorun yaratmadığını ifade etmişler ve klinikte de donörlerden toplanan kondrositlerin dondurularak, gerektiğinde doku kültüründe çoğaltılıp kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Susante ve arkadaşları (1995), kondrositlerin kollajen jel ve aljinat içindeki davranışlarını incelemişlerdir. Kollajen içinde hücreler iyi büyümüşler, ancak bir süre sonra fibroblast benzeri hücrelere dönüşmüşlerdir. Aljinat içindeyse kondrositler fenotiplerini korumuşlar ve proteoglikan sentezi daha fazla olmuştur. Ancak bu malzeme biyobozunur değildir ve *in vivo* olarak kondrositler için uygun ortam oluşturamamıştır. Hücre proliferasyonu açısından kollajen jel daha iyi bir ortam sağlamıştır. Aynı çalışmada demineralize kemik ağın kondrositlerin proliferasyonuna ve biyosentetik aktivitelerine bir katkısı olmadığı da gösterilmiştir.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

Yaylaoğlu ve arkadaşları (1999), osteokondral kayıpların rejenerasyonunda yeni bir yöntem kullanarak, kalsiyum fosfat-kollajen kompozitini yapay ağ olarak kullanmışlardır. *In vitro* çalışmalar normalde birkaç günde çözünen kollajenin çözünme süresinin iki haftaya kadar uzadığını göstermişler. Ayrıca, ortamda normalde olmayan sülfürün bulunmasının sülfüre glukozaminoglikanların oluştuğunun dolaylı göstergesi olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçta, bu ağın osteokondral kayıpların tedavisinde doku mühendisliği amacıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sechriest ve arkadaşları (2000), kondroitin sülfat-A destekli polisakkarid hidrojel kullanmıştır. Bu *in vitro* çalışmada, kullanılan ağ içinde kondrositlerin fenotiplerinin değişmediği ve biyosentetik aktivitelerinin korunduğu gösterilmiştir. Materyalin *in vivo* çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği ve kırıkta doku mühendisliğinde kullanılacak bir biyomateryal olduğu ileri sürülmüştür.

Hiyalüronik asit kırıkta doku mühendisliğinde çalışılan bir başka materyaldir. Hiyalüronik asitin fibronektin fragmanı nedeniyle oluşan kondrolizi engellediği düşünülmektedir. Ayrıca anti inflamatuvar etkileri ve proteoglikan yıkımını önlediği gösterilmiştir. Bu nedenlere dayanılarak kemik iliğinden köken alan mezenşimal hücreler hiyalüronik asit hidrojeline ekilmiş ve hayvan modelinde kırıkta onarımı açısından uygun olabileceği bildirilmiştir.

Otolog kondrosit transferinin öncülerinden olan Brittberg ve arkadaşları kullanılacak ağın biyobozunur olması gerektiğini savunmuşlardır (BRITTBURG, 1996). Materyal bir yandan bozunurken, öte yandan kondrositlerin kendi matrikslerini sentezlemelerine izin vermelidir. Aynı grup ekzojen fibrini kullanarak yapmış oldukları çalışmada, bu malzemenin oldukça inert olduğu için üzerinde kondrositlerin gelişip çoğalmasına izin vermediğini ifade etmişlerdir. Bunun yanında malzemenin viskoelastik özellik taşıması gerektiğini belirtmişlerdir. Karbon lifle yaptıkları deneysel çalışmada oldukça sert olan bu malzemenin kondrosit beslenmesini sağlayan difüzyonu engellediğini bildirmişlerdir.

Sünger formundaki kitosan ağlar da son yıllarda yapay ağ olarak kullanılan materyallerdendir. *In vitro* çalışmalarda transmisyon elektron mikroskobu ile kondrositlerin kitosana oldukça iyi entegre olduğu görülmüştür. Ayrıca uygulanımdaki kolaylığı ve hemostatik özelliği gibi avantajları vardır. Tek dezavantajı yeterince saflaştırılmadığında ileri derece doku reaksiyonu yapabilesidir.

Yoğun ve çok yönlü sürmekte olan çalışmalardan anlaşılacağı gibi, kırıkta doku mühendisliğinde hangi ağın daha üstün olduğu kesinleşmemiştir. Her materyalin avantajları ve dezavantajları mevcuttur.

Ülkemizde ilk olarak 1994 yılında kondrosit hücre kültürüyle ilgili çalışmalara başlanmış ve tek katlı sistemde hayvan ve insan kondrositleri üretilerek incelenmiştir (YILDIZ, 1999). Transplantasyonda veya doku mühendisliğinde kullanılacak kondrositlerin enjekte edilebilir şekli geliştirilmiştir (YILDIZ, 1998). Daha sonra *in vitro* ortamda farklı üç boyutlu matriks yapıları üzerinde ön çalışmalar gerçekleştirilmiş ve geliştirilen kalsiyum fosfat

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

yüklü liyofilize kollajen greft mataryeli üzerinde kondrositler üretilmiş (YAYLAOĞLU, 1999) ve oluşturulan kondrosit içeren matriks yapısı ayrıntılarıyla incelenmiştir (YILDIZ, 1997a, YILDIZ, 1997b).

## Amaçlar:

1. Kondrositlerin üzerinde üreyerek yaşayabileceği yapay destek ağların (matriks) üretilmesi ve karakterizasyonu.
  - 1.1. Kalsiyum fosfat içeren kollajen ağ üretimi
  - 1.2. Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV8, % 8 HV içeren PHBV)'den süngersi ağ üretimi ve yüzey modifikasyonu
  - 1.3. Malzemelerin karakterizasyonu
2. Kıkırdak doku örneklerinden kondrosit hücrelerinin ayrıştırarak üretilmesi ve karakterizasyonu.
3. Destek ağlar üzerine *in vitro* koşullarda kondrositlerin yüklenmesi ve incelenmesi.
4. Bu ağ ve hücre kompozitlerinin *in vivo* kıkırdak defektlerine implante edilerek işlevlerinin saptanması.

## Gereç ve Yöntemler:

### I. Gereçler

#### a. Makine Teçhizat

- %5 CO<sub>2</sub>, 37 °C, %90 nem içeren inkübatör (Sanyo IR, Japonya)
- +4 / -20 °C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Akülü pipet
- Ben Mari
- Elektrikli plastik doku flaskı kesicisi (GATA Ortez ve Protez Atölyesi)
- Hemasitometre
- Küçük cerrahi set (pens, penset, çamaşır klemp, periost elavatörü, bisturi)
- Laminer hava akımlı kabin (Sistem Teknik, Türkiye)
- Leica invert ışık mikroskobu ve video printer (Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Elektromag, Türkiye)
- Olympus Vanox-S ışık mikroskobu (Japonya)
- Otoklav
- Santrifüj (Labofuge 200, Heraeus, Almanya)
- SEM (Model AMR 1000, Leitz, Almanya)
- Vortex
- Zeiss invert ışık mikroskobu (Almanya)

#### b. Sarf Malzemesi

- Aluminyum folyo
- Beherglas (60ml)
- Bisturi
- Cell scraper (Costar, USA)
- Disposable filitre 0,2Mm,
- Etil alkol (%50, %60)
- Gluteraldehit (%8)
- Gelfix (İltaş)
- Köşeli steril doku kültür flaskı (25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>) (Falcon, USA)

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

- Lam / Lamel
- Mezür (100ml)
- Naylon süzgeç 70µm (Falcon, USA).
- Pastör pipeti
- Steril plastik serolojik pipet (5ml, 10ml, 50ml)
- Tris tampon çözeltisi
- Yuvarlak plastik doku kültür flaskı (60 x 20mm) (Falcon, USA)

## c. Kimyasallar

- Fetal Kalf Serum ( Seromed, Almanya)
- Hyaluridaz (Sigma, USA)
- Kollojenaz Tip-II (Biochrom, Almanya)
- L- Glutamin (Seromed, Almanya)
- Penisilin - Streptomisin (Seromed, Almanya)
- RPMI-1640 (Sigma, USA)
- Tisseel Kit (İmmüno AG, Avusturya)
- Tripan mavisi (Sigma, USA)
- Tripsin / EDTA (0,25 / 0,02) (Sigma, USA)

## II. Yöntemler

### 1- Kondrositlerin üzerinde üreyerek yaşayabileceği yapay destek ağların (matriks) üretilmesi ve karakterizasyonu:

#### 1.1. Kalsiyum fosfat içeren kollagen ağ üretimi

Çalışmanın bu aşamasında piyasada bulunan ve deri yaralanmalarının tedavisinde kullanılmakta olan tip 1 kollagen örgüsü –Gelfix®– (Abdi İbrahim, Türkiye, 50x50x50 mm<sup>3</sup>) malzemenin yararlanılmıştır (Şekil 1). Gelfix®'in kalsiyum-fosfat içeriği ile güçlendirilmesi doğrultusunda bu malzeme Tris tampon (100 mM, pH 7.4, 50 mM Tris, 1% NaN<sub>3</sub>) içerisinde kalsiyum çözeltisiyle gece boyu inkübe edilmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra bu işlemler bir kere daha tekrarlanmıştır. Fazla iyonların çıkarılabilmesi için ağ bir gün süreyle distile su içerisinde bırakılmıştır. Kurutulduktan sonrada 7 mm yarıçapında ve 1.9 mm kalınlığında disk şeklinde kesilen ağ etilen oksit gazı ile sterilize edilmiştir (Şekil 2).

#### 1.2. Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV8, % 8 HV İçeren PHBV)'den süngersi ağ üretimi ve yüzey modifikasyonu

Polimer (1g), kloroform:diklorometan (18mL, 1:2 v/v) solüsyonu içinde, mekanik sallama ile çözüldü. Sükroz kristali (50g) içeren petri kabına dökülen solüsyon bir gece boyunca kendiliğinden kurumaya bırakıldı. Matriks 2 gün boyunca diyaliz edilerek içindeki sükrozlar çıkarıldı ve gözenekli bir matriks oluşması sağlandı. Daha sonra -70°C de dondurularak liyofilize edildi. Oluşan gözenekli PHBV8 matriksi oksijen rf-plazması (100W, 20dk) ile işleme sokularak yüzeyi modifiye edildi (Şekil 3). Bu yöntemle matriksin yüzeyinin daha hidrofilik olması sağlandı. 7 mm yarıçapında ve 1.9 mm kalınlığında disk şeklinde kesilen matriks, etilen oksit gazı ile sterilize edildi (Şekil 4).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

## 1.3. Malzemelerin karakterizasyon

### 1.3.1. Tarama Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Elektron Difraksiyon Spektroskopisi (EDS)

Matrikslerin yüzey özellikleri, gözenek yoğunluğu, boyut ve dağılımları SEM ile araştırılmıştır. Bu amaçla, yüzey modifikasyonu yapılmamış PHBV8 (6%), oksijen rf-plazma (100W, 20dk) ile kaplanmış PHBV8 (6%), üzerinde kalsiyum fosfat oluşturulan Gelfix®, ve işleme görmemiş Gelfix® matriksler altın ile kaplanmış ve SEM ile incelenmiştir.

### 1.3.2. Bilgisayarla Gözenek Boyutları Dağılımı Analizi

Bu analiz ile matrikslerdeki averaj gözenek büyüklükleri ve gözenek dağılımı incelenmiştir. SEM ile elde edilen örnek mikrografların bir tarayıcıdan geçirilerek bilgisayar ortamına aktarılmış ve uygun bir görüntü analizi programıyla NIH Image Analysis Program (National Institutes of Health (USA)), gözeneklerin dolu olan bölgelere oranı saptanmıştır.

### 1.3.3. İç Hacim Ölçümü

Bu ölçüm ile birim jel ağırlığı başına düşen matriksler içerisindeki gözeneklerin hacmi bulunmuştur. Önce, oksijen plazma işleminden geçmiş (100 W, 20 dakika) PHBV8 6%, işlemde geçmemiş PHBV8 6%, Gelfix ve Ca-P Gelfix matrikslerinin kuru ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra bu matriksler suya batırılarak su tamamen gözeneklere girene kadar vakum uygulanmıştır. Sonunda matrikslerin ıslak ağırlıkları bulunarak gözenek hacimleri hesaplanmıştır. (Tablo 1).

### 1.3.4. Temas Açısı Ölçümü

Ca-P Gelfix ve PHBV8 matrikslerin yüzeylerinin hidrofilitelerini ölçmek için bu inceleme yapılmıştır. Bir damla su matrikslerin yüzeyine damlatılmış ve temas açıları Cam-Micro (Tantec Inc., USA) ile ölçülmüştür.

### 1.3.5. Degradasyon Çalışması

Degradasyon çalışması için sükröz kristali yüklenmiş ya da yüklenmemiş PHBV8 (6%) matriksleri kullanılmıştır. Matriksler tartıldıktan sonra (0.3-0.5g), içinde fosfat tampon çözelti bulunan (20 mL, pH 7.4, 10 mM, 0.09% Na<sub>3</sub>) kapaklı tüplere konulmuş ve sallamalı su banyosunda 37 °C de 8 hafta boyunca inkübe edilmişlerdir. Belirli aralıklarla örnek alınıp, suyun pH sı tespit edilmiştir. Ayrıca alınan örnekler -70°C de dondurulup, liyofilize edilmiş ve tartılmıştır. Aradaki ağırlık farkından gravimetrik olarak resorbe olan miktar tayin edilmiştir. Böylece, gözenek oluşumu amacıyla kullanılan sükröz kristalinin, PHBV8 (6%) in degradasyonundaki etkisi gözlemlenmiştir.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



## 2- Kıkırdak doku örneklerinden kondrosit hücrelerinin ayrıştırarak üretilmesi ve karakterizasyonu:

### 2.1. Kıkırdak Doku Örneğinin Alınması

Çalışmanın bu aşamasında elde edilme kolaylığı ve denek hayvanı (tavşan) kaybına yol açmamak için cerrahi sonucu çıkartılması zorunlu insan eklem kıkırdağı kullanılmıştır. Kıkırdak total diz protezi uygulanan hastalardan steril koşullar altında alınmıştır.

### 2.2. Doku Örneğinin Laboratuara Nakli

Örnek doku 10 ml taşıma solüsyonu içeren steril tüp içinde hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Örnekler RPMI 1640 ve 1 ml Penisilin solüsyonula yıkanarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. İlk 4 saat 37°C'de inkübatörde bekletilen dokular daha sonra çalışma gününe kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

### 2.3. Mekanik Parçalama İşlemi

35mm'lik petri kaplarına alınan doku örnekleri daha sonra 15 numaralı bistüri kullanarak diseksiyon mikrasokopu altında 0.5 mm'den küçük parçalara ayrılmıştır.

### 2.4 Enzimatik Ayrıştırma

Kıkırdak doku örnekleri RPMI 1640 çözeltilisiyle yıkanıp temizlendikten sonra 1mg/ml tip 2kollejenaz çözeltilisi içerisinde bir gece bekletilerek enzimatik hücre ayrıştırması gerçekleştirilmiştir. İkinci gün ayrışmayı tamamlamak üzere pipetaj yapılarak tüpte toplanan hücrelere 3 ml RPMI 1640 çözeltilisi eklenmiş ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün altında kalan hücrelerin üzerine 10 ml kültür çözeltilisi eklenerek cam pipet yardımıyla homojenize edilen hücre çözeltilisi 1 dk süreyle vorteks cihazında çalkalanmış ve flasklara ayrıştırılmıştır. Her flask içine 3 ml besi yeri (RPMI 1640 100 ml, 20 ml Fetal Bovine Serum, 1.5 ml L Glutamin, 1 ml Penisilin-Streptomisin) eklenerek primer hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %90 nem ortamında, inkübatör içinde takibe alınmıştır. Hücrelerin flaska tutunmaları ve çoğalmaya başlamaları invert mikroskopta takip edilerek gün aşırı besi yerleri yenilenmiştir.

### 2.5. Kondrositlerin Canlılığının Saptanması ve Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

Kondrositlerin canlılığının saptanması ve canlı hücre sayısının belirlenmesi için 10ml'lik hücre çözeltilisinden 100 µl alınarak 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konulmuş ve 1ml'lik pipet kullanarak 0.8 ml mediumdan tüpe eklenmiştir. Tüpe daha sonra 100 µl tripan mavisi tüpe eklenerek 30 saniye vorteks cihazında karıştırılmıştır. Bu karışımdan bir damla alınarak temiz bir hemositometreye boyanmış hücreler aktarılmıştır. Düşük büyütmede (x10) dört büyük karedeki hücreler (dairesel, net konturlu hücreler canlı, patlamış ve maviyeye boyanmış hücreler ise ölü olarak) sayılmıştır. Hemositometrenin her iki taraftaki dört karedeki canlı hücrelerin toplam sayısı dörde bölünerek ortalama bulunmuştur.

### 2.6. Hücrelerin İnkübasyonu

Ayrıştırmanın 7-10. günlerinde toplam canlı hücreler sayılarak iki milyondan az hücre varlığında bu hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü flasklarına, iki milyondan fazla hücre

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

varlığında 75 cm<sup>2</sup>'lik doku kültür flasklarına aktarılacak alt kültürler geçilmiştir. Alt kültürler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %90 nem ortamında, inkübatör içinde takip edilmiştir.

## 2.7. Tripsinizasyon İşlemi ve Alt (Sub) Kültürler

Ortalama 15 (13-17) günde kondrositler materyallere aktarılmaya hazır hale gelmiştir. Hücreler tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmış ve tüp içine alınmıştır. Hücrelere 3 ml besi yeri eklenerek 1200 rpm de santrifüj edilmiştir. Üste kalan çözeltinin uzaklaştırılmasından sonra karakterizasyon ve biyomateryallere aktarılacak üzere 1 ml kondrosit çözeltisi elde edilmiştir.

## 2.8. Kondrositlerin Tanınması

**2.8.a. Kondroblast Hücrelerin Parçalanması:** Hücre kültürü şişesinde (Greiner GmbH, Almanya) % 100 oranında üremesini tamamlamış olan 6. pasaj seviyesindeki kondroblast hücreleri, buldukları hücre üretme vasatı içinde özel kazıyıcılar yardımıyla kazındı. Tutdukları hücre kültürü şişesinden kitlesel olarak kaldırılan hücreler 1200 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilerek pellet konumuna getirildi. Elde edilen hücreler proteaz inhibitörü içeren (1mM EDTA ve 1mM PMSF) ve buz kabı içinde soğutulmuş tamponlu fosfat solüsyonu (PBS) içinde iki kez yıkandıktan sonra, elde edilen son pellet tartılarak son hacimin % 40'ı (a/h) olacak şekilde resüspanse edildi. Örnek iki kez dondurulup çözüldükten sonra kullanılabilecek kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

**2.8.b. Kollagen II'nin Western Blot Yöntemiyle Saptanması:** Protein separasyonu standart denatüran sodyum dodesil sülfat - poliakril amid jel elektroforez (SDS-PAGE; Laemmli 1974) işlemi ile gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan hücre lizisi redüktan örnek tamponu içinde (Tris baz, pH 7.6; SDS; Gliserol; Glisin; β-merkaptolanol) 1:1 olacak şekilde karıştırılarak 5 dakika süreyle kaynatıldı. Soğuyan örnekler üstüste % 5 ve % 10 konsantrasyonda jel içeren diskontinyus vertikal elektroforez aparatında (Hoefer Scientific, ABD) ve 200 V potansiyel altında 4 saat süreyle koşturuldu. Örnekler jele aynı protokole sahip bir çift seri olarak yüklendi.

Süre sonunda bir birinci seri örnekler Commasie Blue ile boyanırken, diğer jel parçası transfer tamponu içinde (Metanol; SDS; Glisin; Tris baz, pH 7.8) 20 dakika bekletildi ve daha sonra separe proteinler yarı ıslak blotlama sistemi (BioRad, UK) ile 45 dakika süreyle 25 Voltta polivinilidin diflorid kağıda transfer edildi.

Transfer membranı kurutulduktan sonra % 3 yağsız süt tozu, % 1 At serumu ve % 0.05 Tween 20 içeren TBS (Tris, Borik asit ve Sodyum asetat) ile gece boyunca oda derecesinde bloklandı. Bu basamağı takip eden tüm işlemler 37°C'ye ayarlı hibridizasyon fırınında (Stuart Scientific, UK) borosilikat tüpler içinde 50 devir/dakika rotasyonel hızda gerçekleştirildi. TBS ile yapılan yoğun yıkama işlemlerinden sonra membran Kollajen-II spesifik monoklonal antikor (primer antikor, Klon 2B1.5, MS-235-P, NeoMarkers, Ca, ABD) ile 1 saat 37°C'de muamele edildi. Benzer şekilde yapılan yıkamalardan sonra membran ikincil antikor (sekonder antikor, biotin ile işaretli anti-fare IgG, Amersham Buchler GmbH, Almanya) ile aynı şartlarda muamele edildi. Son işaretleme yaban turbu peroksidazı (HRPO) ile işaretli streptoavdin-biotin kompleksinin (Amersham Buchler GmbH, Almanya) ilavesi ile

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

yapıldı. Bantlar -20°C'de soğutulmuş metanolde çözülmüş n-kloro naftol ve % 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesiyle gözlemlendi.

### 3. Destek ağlar üzerine *in vitro* koşullarda kondrositlerin yüklenmesi ve incelenmesi:

Kullanılan malzemelerin tümü hücre yüklenmeden önce bir gün süresince üzerlerini kaplayacak kadar besi yeri içinde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %90 nem ortamında, inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler yüklenmeden hemen önce malzemelerin içinde bekletildiği besi yeri uzaklaştırılmıştır. İçerisinde yaklaşık 1 Milyon hücre bulunduran 1 ml'lik çözeltiden 150 µl her bir malzemenin üzerine eşit oranda aktarılmıştır. Bu aşamada kullanılan malzemeler aşağıda belirtildiği gibi numaralandırılmıştır:

- 1- İşlenmemiş Gelfix
- 2- Gelfix Ca-P
- 3- Yüzeyi modifiye edilmiş PHBV
- 4- Yüzeyi modifiye edilmemiş PHBV

Hücre içeren malzeme kompozitler bir gece bekletildikten sonra her bir kompozitin üzerine 500 µl besi yeri eklenmiştir. Takip eden günlerde besi yeri gün aşırı değiştirilmiş ve kompozitlerin üzerlerini kaplayacak kadar besi yeri konulmuştur.

Yedi ve onbeşinci günlerde *in vitro* incelemenin gerçekleştirilebilmesi için kompozitler %10 formalin tampon içine konulmuştur. Kompozitler histoloji ve SEM yöntemleriyle incelenmiştir.

#### 3.1. Tavşan kökenli kıkırdak hücrelerinin elde edilmesi:

Çalışmanın bu aşamasında kondrositler erişkin yerel beyaz tavşanlardan elde edilmiştir. Ortalama ağırlıkları 3250 gr olan 1 yaşın üzerindeki 3 tavşanın omuz ekleminden (Şekil 5) kıkırdak dokusu alınmıştır. Cerrahi işlem sırasında enfeksiyonun önlenmesi için koruyucu antibiyotik (cephazolin sodyum, 15mg/kg) kas içine uygulanmıştır. Cerrahi steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Anestezi amacıyla kas içine ketamin hidroklorit (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorit (5 mg/kg) kullanılmıştır.

Kültür ortamında üretilen kıkırdak hücrelerinin canlılığı tripan mavisi testi ile saptanmıştır. Canlı hücre sayısı Toma lamı kullanılarak sayıldı ve hesaplanmıştır. Bir mililitrede 1.5 milyon hücreye ulaşıldığında hücreler doku kültürü plağından kaldırılarak 100 mikrolitrelik çözeltiliye aktarılmıştır. Doğunluğa ortalama 20. günde ulaşan hücreler yüzeyi modifiye edilmemiş PHBV8 ve Ca-P Gelfix üzerine yüklenmiştir. Kontrol grubu olarak hücre aktarılmayan, yüzeyi modifiye edilmemiş ağlar kullanılmıştır.

#### 3.2. Mikroskopik inceleme:

Hücre içeren ağ yapılar % 10 formol çözeltisinde tesbit edildikten sonra sıralı alkollerden geçirilerek parafin bloklara alınmıştır. Kalınlığı 5 µm'lik kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (HE) ve Papanicoloau (PAP) yöntemleriyle boyanmış ve incelenmiştir.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

Histopatolojik incelemede kültür örneklerinin niteliği nedeniyle hücre bloğu adı verilen olağan yöntemin dışında bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde az miktarda hücre içeren doku örnekleri santrifüj sonrasında parafine gömülerek 3-5 µm (mikron)'luk kesitler alınmış ve HE ile boyanmıştır.

#### 4. Yapay ağ ve hücre kompozitlerinin *in vivo* kıkırdak defektlerine implante edilerek işlevliliğinin saptanması:

Kıkırdak defektinin oluşturulması ve *in vivo* implantasyon çalışmalarında ortalama ağırlıkları 3250 gr olan 8 erişkin yerel beyaz tavşan kullanılmıştır. Tavşanlar aspirasyon pünomonisinin gelişmesini önlemek için cerrahi öncesi 12 saat aç bırakılmıştır. Her iki diz steril koşullar altında örtülmüştür. Tavşanların diz eklemlerine 2.5 cm'lik medial parapatellar insizyonla girilmiştir. Cilt altı bağ dokusu geçilerek retinakulum küt olarak diseke edilmiştir. Fascia lata kesilerek patellar bağa 0.5 cm lateralden yapılan bir insizyonla diz ekleminin içine ulaşılmıştır. Dış yan bağ laterale aktarılırken Quadriceps femoris, vastus lateralis ve biceps femoris kaslarının arasından diz eklemine ulaşılmıştır. Femoral interkondiler alana 11 numara bistüri ile yaklaşık 3mm çapında osteokondral defekt oluşturulmuştur. Aynı defekt sol diz ekleminde de oluşturulmuştur. Subkondral kanama fibrin kullanılarak durdurulmuş ve implantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Eklem serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra bir adet vida ile ağlar defekte tespit edilmiştir. Osteokondral defekt oluşturulduktan sonra defektler son konsantrasyonu 1 U/ml olan hiyaluridaz ile 5 dk yıkanarak yerel glikozaminoglikanların depolimerize edilerek bölgenin antiadesiv özelliğinin yokedilmesi sağlanmıştır. Sağ dize hücre yüzeyi modifiye edilmemiş PHBV8 ve Ca-P Gelfix ve sol dize kontrol amacıyla hücre içermeyen yapay ağlar uygulanmıştır. Cerrahi sonrası hiçbir tavşanda enfeksiyon gelişmediği gözlenmiştir.

Belirlenen zaman aralıklarında hayvanlar öldürülerek eklem yüzleri önce makroskopik daha sonra mikroskopik olarak incelenmiştir. Mikroskopik inceleme için hayvanların ekstremite kalçalarından dezartiküle edilerek formol içinde fikse edilmiştir. İnceleme için tavşanların diz eklemlerine artrotomi uygulanıp defekt bölgesinin makroskopik görüntülerinin alınmasını takiben % 10'luk formik asit içinde tesbit edilen dokular daha sonra %10'luk nitrik asitte 5-7 gün süreyle dekalsifiye edilmiştir. Defekt tamiri yapılan alanlardan 4 - 6 mikron kalınlığında kesitler mikrotomla alınarak Hematoksilen & Eozin ile boyanmıştır.

## Bulgular

### 1. Tarama Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Elektron Difraksiyon Spektroskopisi (EDS)

SEM incelemeleri, üzerinde kalsiyum fosfat oluşturulan Gelfix® (Şekil 2) ve işleme görmemiş Gelfix® matrikslerinin gözenekli yapılarının olduğu göstermiştir. Kalsiyum fosfat içeren Gelfix®'in kıkırdağın altında bulunan subkondral kemiğe daha yakın bir yapıda olduğu ve kondrosit üremesine elverişli olduğu kanaatine varılmıştır. PHBV8 (6%) matrikslerinin incelenmesinde ise yüzey modifikasyonu yapılmamış PHBV8 (6%) matriksinin, oksijen rf-plazma (100W, 20dk) ile kaplanmış PHBV8'e (6%) göre daha düzenli, kompakt ve az gözenekli olduğu görülmüştür (Şekil 4). Oksijen rf-plazma (100W, 20dk) ile kaplanmış

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

PHBV8 (6%) matriksinde bulunan gözeneklerin kondrosit üremesine daha fazla olanak vereceği kanaatine varılmıştır.

EDS yöntemiyle Ca-P Gelfix matriksinin yapısındaki kalsiyum ve fosfat oranı saptanmıştır. Kalsiyum'un fosfat'a oranı 2.26 (iki ölçüm ortalaması) olarak bulunmuştur (Şekil 6).

## 2. Bilgisayarla Gözenek Boyutları Dağılımı Analizi

Üzerinde kalsiyum fosfat oluşturulan Gelfix® ve işlem görmemiş Gelfix® matrikslerinin averaj gözenek büyüklükleri 0.575 ve 0.610 mm olarak bulunmuştur. Aralarında gözenek büyüklüğü bakımından belirgin fark olmamakla birlikte in vitro deneylerinde de görüleceği üzere kalsiyum fosfat içeren Gelfix®, kondrosit üremesi bakımından daha elverişli bir matriksdir. Bu analiz ile oksijen rf-plazma (100W, 20dk) ile kaplanmış PHBV8 (6%) matriksinin gözenek büyüklüğü 726 µm olarak bulunmuştur. Bu gözenek büyüklüğü kondrosit üretimi için uygun olup yüzey modifikasyonu yapılmamış PHBV8 (6%) matriksinden daha iyi bir üreme ortamı sağlayacağı varsayılmıştır.

## 3. Temas Açısı Ölçümü

Plazma işlemi sonrasında yüzeyin gözenekli ve çok hidrofilik hale gelmesi nedeniyle nedeniyle yüzeye damlatılan su damlaları yüzey tarafından emilmiş ve temas açısı ölçülememiştir.

## 4. İç Hacim Ölçümü

İç hacim ölçümleri, Gelfix matrikslerinin PHBV lerden daha fazla gözenekli olduğunu göstermiştir. PHBV matrikslerine uygulanan oksijen plazma işlemi iç hacim ölçümlerini etkilemezken Gelfix matrikslerine kalsiyum fosfat eklenmesi iç hacim ölçümlerini azaltmıştır. Bu da beklenen bir sonuçtur (Tablo 1).

## 5. Degradasyon Çalışması

180 gün sonra, yapım aşamasında sükroz kristali içermeyen ve içeren PHBV8 (6%) matrikslerinin içinde bulunduğu tampon çözeltideki pH azalması 0.16 ve 0.17 birim olarak bulunmuştur. Ortam pH sındaki en yüksek düşüş, en yüksek degradasyonu işaret etmektedir. Yapım aşamasında ortamda bulunan sükroz kristali, matriksin yapısının daha gözenekli olmasını sağlamış ve bu gözenekli yapı degradasyon oranını artırmıştır (Şekil 7). 180 gün sonunda, ortam pH sındaki değişikliğin yanısıra örneklerin kalınlıklarında da artma gözlemlenmiştir (Tablo 2). Zamanla polimer içerisindeki gözenek bağlantılarının degradasyonu ve matriksin su tutması kalınlıkları artırmıştır. Bu da, kondrositlerin zaman içerisinde çoğalıp, büyümelerinin bir sıkışıklık sonucu engellenmeyeceğini ve yer sorunu olmayacağını göstermektedir.

## 6. Kondrositlerin Karakterizasyonu: Tip II Kollajen Analizi

İzole hücrelerin tip II kollajen sentezledikleri saptanmıştır (Şekil-8).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

## Hücre İçeren Yapay Ağların *In Vitro* İncelenmesi

Hücre içeren ve içermeyen ağlar 21 gün süresince *in vitro* ortamda birlikte inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücre aktarılan materyalin içinde bulunduğu besi yerinin hücrelerce kullanıldığı ve renk değişikliğine uğradığı saptanmıştır. Eş zamanlı olarak hücre içeren malzemede hücrelerin ağırlığı nedeniyle kültür plağının dibine çöktüğü ve saydamlaştığı gözlenmiştir.

### Makroskopik Bulgular

1. İşlenmemiş Gelfix: Besi yeri içinde 3. günde çapı yaklaşık % 70 küçüldüğü ve yapısının jelatinleştiği izlendi. 14. günde malzeme ileri derecede yapısal özelliklerini kaybetmiş ve deforme olmuştur.
2. Gelfix Ca-P: Yapısında belirgin bir bozulma saptanmamıştır.
3. Yüzeyi modifiye edilmiş PHBV: Sert yapısını korumuş ancak bir miktar deformasyon gözlenmiştir.
4. Yüzeyi modifiye edilmemiş PHBV: Sert yapısını korumuştur.

Ca-P içermeyen Gelfix'in sıvı ortamda hızla bozulduğu ve hücre taşımada uygun bir matriks oluşturamayacağı kanaatine varılmıştır. Buna karşılık Ca-P ile çapraz bağlanmış Gelfix'in kondral hücrelerin üzerinde büyümeleri için uygun bir matriks oluşturduğu saptanmıştır.

PHBV8'in plazma rf ile yüzey özelliklerinin değiştirilmesinin 7. günde hücre sayısını etkilediği ancak 14. günde yüzey özellikleri değişmemiş PHBV8 ile aynı sayıda ve özellikte kondral hücre barındırabildiği gözlenmiştir.

Bundan sonraki çalışmalara Ca-P Gelfix ve Yüzeyi modifiye edilmemiş PHBV8 matrikslerin kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.

### Mikroskopik Bulgular

HE boyama yöntemi ile incelemede hücrelerin her iki malzeme içerisinde de ürediği ve canlılıkların korudukları gözlemlendi.

PAP boyama ile sitolojik incelemede yayma zemininde miksokondroid bir matriks izlenmiştir (Şekil 9a) Genellikle koheziv gruplar halindeki hücrelerin perinükleer vakuol içerdikleri ve sık binükleasyon gösterdikleri dikkat çekmiştir. Nükleuslarda hafif derecede anizokaryozis (pleomorfizm) gözlenmiştir. Bu özelliklerin sitolojik olarak kondrositik diferansiyasyonla uyumlu olduğu düşünülmüştür.

Kültürdeki hücrelerin çoğunun normal kondrositlere göre daha fazla hücresel pleomorfizm gösterdiği dikkati çekmiştir. Kondroid matriks içinde normal bir matrikste görülene oranla daha fazla sayıda hücre (hipersellüler) izlenmiştir. Ayrıca hücrelerde binükleasyon görülme sıklığı artma saptanmıştır. Bu özellikler kondrositlerin aktif bir şekilde

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

prolifere olduklarına ve kondroid matriks yaptıklarına işaret etmektedir. Benzer sitolojik görünümlere enkondroma veya kondroblastoma gibi neoplastik lezyonlarda rastlanabilmektedir. Bu çalışmada az sayıda kondrosit içeren matür bir hyalin kırık yapı sadece kontrol örneğinde görülmüştür (Şekil 9b). Kültür örneklerinin histolojik özellikleri aşağıda görülmektedir:

## Hücre İçeren Yapay Ağların *In Vivo* İncelenmesi

Tavşanlar 8 ve 20 haftalık iki zaman diliminde öldürülerek makroskopik ve mikroskopik incelemeler gerçekleştirilmiştir. *In vivo* çalışma sadece PHBV8 malzemeyle gerçekleştirilmiştir.

## Makroskopik Bulgular

Sekiz haftalık takipte hücre ve yapay ağın birlikte ve sadece ağın uygulandığı kırıkta yaralanmalı bölgelerin sınırlarının düzgün ve kolayca algılanabildiği izlendi (Şekil-10). Sadece ağın olduğu bölgede kapanmanın bölgesel olduğu ve kondroid özellik göstermediği saptandı. Buna karşın hücre ve yapay ağın birlikte uygulandığı yaralanma alanının kapanmasının tama yakın olduğu ve kondroid yapıya benzer doku geliştiği gözlemlendi.

Yirmi haftalık takipte sadece ağın uygulandığı bölgelerde kapanmanın bölgesel olduğu ve kondroid yapının tam gelişmediği gözlenirken hücre ve yapay ağın birlikte uygulandığı yaralanma alanının sınırlarının artık belli olmadığı ve yapının normal eklem kırığına dönüştüğü izlendi (Şekil 11). Eklemlerde hipertrofik ve osteofitik değişiklikler hem ağın tek başına hem de hücreyle birlikte kullanıldığı durumlarda geliştiği gözlenirken bu değişikliklerin hücre içeren ağı tarafta daha hafif olduğu saptandı.

## Mikroskopik Bulgular

Sekiz haftalık takipte sadece ağın uygulandığı bölgelerde polimer boşlukları, çevrede fibröz doku oluşumu, minimal yabancı cisim granülasyon dokusu ve bu doku içerisinde neovaskülarizasyonun olduğu görülmektedir (Şekil-12). Ağ ile komşu kemik arasında yeni kemiksi doku gelişimi gözlenirken kondrogeniz izlenmemiştir (Şekil-13). Buna karşılık hücre ve ağın birlikte uygulandığı kesitlerde kondroid ağın oluştuğu ve hücrelerin bu ağ içerisinde canlılıklarını korudukları saptanmıştır. Kondrogeniz ve yeni kemik gelişimi saptanmıştır.

Yirmi haftalık takipte sadece ağ uygulanan tarafta yaralı bölgenin yüzeyini kaplamaya başlayan kondrogeniz izlenirken ağın altında minimal yabancı cisim granülasyon dokusunun varlığı dikkati çekmektedir. Buna karşın ağ ve hücrenin birlikte uygulandığı tarafta ağın eklem yüzünde düzenli olmamakla birlikte kondrosit proliferasyonu izlenmektedir (Şekil-14).

Ağ ve hücre içeren ağa ait 8 ve 20 haftalık bulgular defektin kapanması, kondroid ağ gelişimi, fibröz doku gelişimi ve polimerin varlığına yönelik skorlama gerçekleştirilmiş ve Tablo 3'de sunulmuştur.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

## Tartışma

Gerçekleştirilen çalışmayla güncel bir sorun olan eklem kıkırdağı yaralanmalarının tedavisine doku mühendisliği yöntemleriyle yeni bir boyut getirilmiştir. Çalışmada üretilen her iki yapay ağ (Ca-P-Gelfix ve PHBV) hücre kültüründe üretilen kondrositlerle uyum sağlamış ve bu hücrelerin üzerlerinde gelişmelerine izin vermiştir. Hücre içersin veya içermesin PHBV8 yapay ağları uygulandıkları kıkırdak dokuyla uyum sağlamış ve doku iyileşmesine yardımcı olmuştur. In vivo uygulamada PHBV8 ağın kıkırdak dokuda çok az bir yabancı cisim yanıtı oluşturduğu ve bu yanıtın da damar gelişmesi açısından zengin subkondral kemik seviyesinde geliştiği gözlenmiştir. Bu bulgular daha önce kontrollü antibiyotik salımı amacıyla üretilen ve kullanılan benzer polimerlerle elde edilen sonuçlarla (KORKUSUZ, 2001) uyumludur. PHBV8'le Ca-P-Gelfix karşılaştırıldığında özellikle sıvı ortamlarda PHBV8'in deforme olmadan daha uzun süreler dayanabildiği ve yapay ağ olarak kullanılmasının daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır. Kondrosit içeren PHBV8 yapay ağları kullanıldığında makroskopik ve mikroskopik anlamda kıkırdak dokusunun tama yakın iyileştiği gözlenmiştir.

## Sonuç ve Katkıları:

Yapay kıkırdağın üretilmesiyle eklem kıkırdağı hasarı nedeniyle (spor sakatlığı, travma, ileri yaşta eklem kıkırdağında hasar vb.) rahatsızlığı olan hastaların tedavisinde güncel ve ekonomik bir yaklaşım sağlanmıştır. Hem Ca-P-Gelfix hem de PHBV8 kondrositlerin hasarlı eklem kıkırdağının iyileştirilmesine yönelik yapay destek üretilmesinde kullanılacak malzemelerdir. Bu malzemelerin gerek üzerine aktarılan hücreler gerekse uygulandıkları dokuyla uyumları iyidir.

Gerçekleştirilen çalışma gelecekte diğer yapay doku veya organ (karaciğer, deri vb.) mühendisliği çalışmalarına alt yapı oluşturabilecektir. Gelecekte kıkırdak doku mühendisliğine yönelik gerçekleştirilecek çalışmalarda (a) polimer ve hücre yapısına büyüme etmenlerinin eklenmesi ve (b) elde edilen yapay kıkırdak dokusunun mekanik sağlamlığının incelenmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda uygun bölgesel büyüme faktörlerinin saptanması, bunların etkin doz aralığının bulunması ve bu etmenlerin kıkırdağın hangi aşamasında nasıl etki ettiğinin anlaşılmasına yönelik ön çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca in vivo ortamda mekanik sağlamlığı saptayacak kıkırdak indent cihazı veya ultrasonic uçların (probların) geliştirilmesi yeni bir araştırma konusu olarak önerilebilir. Çalışmanın bir sonraki aşamasının daha büyük bir hayvanda gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Bu yapay ağların insane uygulanmasından önceki son aşamadır.

Evrensel bilim açısından değerlendirildiğinde günümüzde ortopedi ve travmatoloji alanındaki çalışmaların ağırlıklı olarak eklem kıkırdağına yönelmiş olduğu bilindiğinden ve üç boyutlu biyolojik yapıların üzerinde kıkırdak hücrelerinin üretilmesiyle yapay kıkırdak yapımına yönelik çalışmalar devam ettiğinden elde edilen verilerin uluslararası kongrelerde kabul görmekte ve yayına dönüşebilmektedir. Elde edilen her iki yapay ağ için patent alınması söz konusudur.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

Elde edilen veriler doku mühendisliği, malzeme bilimleri ve sağlık bilimleri alanının tıp ve veteriner hekimlik (ağırlıklı olarak ortopedi ve travmatoloji) alanlarınca kaynak olarak kullanılabilir.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

## Kaynaklar

BEHRAVESH E., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G., Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications, *Clin Orthop*, 367S,118-30, (1999).

BEN-YISHAY A., Grande D.A., Menche D., Pitman M.D., Schwartz R.E., Repair of articular cartilage defects with collagen-chondrocyte allograft, *Tissue Eng*, 2,119-33, (1995).

BRITTBERG M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L., Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes, *Clin Orthop*, 326,270-83, (1996).

BRITTBERG M., Autologous chondrocyte transplantation, *Clin Orthop*,367S,147-55, (1999).

BUCKWALTER J.A., Mankin H.J., Articular cartilage (Part II): Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation, *J Bone Joint Surg*, 79A,612-27, (1997).

BUCKWALTER J.A., Articular cartilage: Injuries and potential for healing, *J Orthop Sports Phys Ther*,28,192-202, (1998).

CAO Y., Vacanti J.P., Paige K.T., Upton J., Vacanti C.A., Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of human ear, *Plast Reconstr Surg*, 43,297-304, (1997).

COUTTS R.D., Sah R.L., Amiel D., Effects of growth factors on cartilage repair, *Instructional Course Lectures*, 46,487-94, (1997).

EDWARDS R.C., Kiely K.D., Eppley B.L., The fate of resorbable poly-L-lactic/polyglycolic acid (LactoSorb) bone fixation devices in orthognathic surgery, *J Oral Maxillofac Surg*, 59,19-25, (2001).

FREED L.E., Novakovic G.V., Marquis J.C., Langer R., Kinetics of chondrocyte growth in cell-polymer implants, *Biotech Bioeng*, 43:597-604, (1994).

GIRDLER N.M., Bioengineering of cartilage in organ cartilage, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 24,318, (1995).

GLIMCHER M.J., Koide S., Shapire F., Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage, *J Bone Joint Surg*, 74A,532-53, (1993).

GRANDE D.A., Breitbart A.S., Mason J., Paulino C., Laser J., Schawartz R.E., Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions, *Clin Orthop*, 367S,176-86, (1999).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

HARRISON E.T., Luyten F.P., Reddi A.H., Transforming growth factor beta: its effect on phenotype reexpression by dedifferentiated chondrocytes in serum free medium, *Exp Cell Res*, 192,340-5, (1991).

HENDRICKSON D.A., Nixon A.J., Grande D.A., Todhunter R.J., Minor R.M., Erb H., Lust G., Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects, *J Orthop Res*, 12,485-97, (1994).

HOMMINGA G.N., Buma P., Koot H.W., van der Kraan P.M., van der Berg V.M., Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro, *Acta Orthop Scand*, 64,441-5, (1993).

HUNZIKER E.B., Rosenberg L.C., Repair of partial thickness articular cartilage defects. Cell recruitment from the synovium, *J Bone Joint Surg*, 78A,721-33, (1996).

HUNZIKER E.B., Biologic repair of articular cartilage: Defect models in experimental animals and matrix requirements, *Clin Orthop*, 367S, 135-47, (1999).

JACKSON D.W., Simom T.M., Tissue engineering principles in orthopaedic surgery, *Clin Orthop*, 367S, 31-45 (1999).

KAWAMURA S., Wakitani S., Kimura T., Articular cartilage repair: Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it, *Acta Orthop Scand*, 69,56-62, (1998).

KORKUSUZ F., Korkusuz P., Ekşioğlu F., Gürsel İ., Hasırcı V., In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems, *J Biomed Mater Res*, 55,217-28, (2001).

LANGER R., Vacanti J.P., Tissue engineering, *Science*, 260,920-6, (1993).

MA X.P., Schloo B., Mooney D., Langer R., Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage, *J Biomed Mater Res*, 29:1587-95, (1995).

MANKIN H.J., The response of articular cartilage to mechanical injury, *J Bone Joint Surg*, 64A,460-66, (1982).

MESSNER K., Gillquist J., Cartilage repair. A critical review, *Acta Orthop Scand*, 67, 523-9, (1996).

MOW V.C., Wang C.C.B., Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage, *Clin Orthop*, 367S,204-24, (1999).

NEWMAN A.P., Articular cartilage repair, *Am J Sports Med*, 26,309-24, (1998).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

O'DRISCOLL S.W., Salter R.B., The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neocondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion, *Clin Orthop*, 208,131-40, (1986).

O'CONNOR W.J., Botti T., Khan S.N., Lane J.M., The use of growth factors in cartilage repair, *Orthop Clin North Am*, 31,399-409, (2000).

ÖZKAN İ., Shino K., Nakamura N., Natsu-ume T., Matsumoto N., Horibe S., Tomita T., Kaneda Y., Ochi T., Direct in vivo gene transfer to healing rat patellar ligament by intra-arterial delivery of haemagglutinating virus of Japan liposomes, *Europ J Clin Invest*, 29,63-7, (1999).

PUELACHER W.C., Kim S.W., Vacanti J.P., Schloo B., Mooney D., Vacanti C.A., Tissue-engineered growth of cartilage: The effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices, *Int J Maxillafac Surg*, 23,49-53, (1994).

SCHREIBER R.E., Ilten-Kirby B.M., Dunkelman N.S., Symons K.T., Rekettye L.M., Willoughby J., Ratcliffe A., Repair of osteochondral defects with allogenic tissue engineered cartilage implants, *Clin Orthop*, 367S,382-95, (1999).

SECHRIEST V.F., Miao Y.J., Niyibizi C., Westerhausen-Larson A., Matthew H.W., Evans C.H., Fu F.H., Suh J.K., GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis, *J Biomed Mater Res*, 49,534-41, (2000).

SHORTKROFF S., Barone L., Hsu H.P., Wrenn C., Gagne T., Chi T., Breinan H., Minas T., Sledge C.B., Tubo R., Spector M., Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model. The role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage, *Biomaterials*,17, 147-54, (1996).

SPEER D.P., Chvapil M., Volz R.G., Holmes M.D., Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants, *Clin Orthop*, 144,326-35, (1979).

SUSANTE J.L.C., Buma P., Osch G.J.V.M., Versleyen D., Kraan P.M., Berg W.B., Homminga G.N., Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gells, *Acta Orthop Scand*, 66,549-56, (1995).

ÜZÜMCÜGİL O., Cile E., Ataoğlu Ö., Atalay N., Balçık C., Korkusuz F., Menisküs allogreftlerinin osteoartrit gelişimini önlemedeki rolü, *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 35,71-78, (2001).

VACANTI C.A., Paige K.T., Engineering new tissue: Formation of neo-cartilage, *Tissue Eng*, 2,9106, (1995).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR

VACANTI C.A., Vacanti J.P., The science of tissue engineering, *Orthop Clin North Am*, 31,351-5, (2000).

VUNJAK-NOVAKOVIC G., Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage, *J Orthop Res*, 17,130-8, (1999).

WAKITANI S., Kimura T., Hirooka A., Ochi T., Yoneda M., Yasui N., Owaki H., Ono K., Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel, *J Bone Joint Surg*, 71B,74-80, (1989).

WAKITANI S., Goto T., Pineda S.J., Young R.D., Mansour R.J., Caplan A.I., Goldberg V.M., Mesenchymal cell based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage, *J Bone Joint Surg*, 74A,579-92, (1994).

YAYLAOGLU M.B., Yıldız C., Korkusuz F., Hasırcı V., A novel tissue engineered osteochondral implant, *Biomaterials*, 20,1513-20, (1999).

YILDIZ C., Bahçe M., Korkusuz F., Hasırcı V., Eklem kırıkdağı defektlerinde yeni bir tedavi yaklaşımı: Kırıkdağı doku mühendisliği, XVI. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongre Kitabı, 150-3, (1999).

YILDIZ C., Bahçe M., Şehirlioğlu A., Tunay S., Erler K., Başbozkurt M., Oğur G., Gür E., Enjektabl kondrosit, *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2,37-41, (1998).

YILDIZ C., Oğuz E., Bujia J., Aigner J., Monolayer sistemde kondrosit kültürü üretimi, XV. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongre Kitabı, 908-10, (1997).

YILDIZ C., Bahçe M., Başbozkurt M., Oğur G., Oğuz E., Deveci S., Gür E., Cultured chondrocytes in monolayer system, *Turkish J Bone Joint Surg*, 3,88-93, (1997).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

**Tablo 1.** PHBV8 ve Gelfix matrikslerinin gözenek hacimleri

<b>Matriks Tipi</b>	<b>Gözenek Hacmi (mL/g kuru jel)</b>
PHBV8 6%	9.16 ± 1.03
PHBV8 6% *OP	8.95 ± 1.55
Gelfix	29.96 ± 8.17
Ca-P Gelfix	13.22 ± 5.65

\*OP: Oksijen plazma ile işlem görmüş matriks (100W, 20min)

<b>Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı</b>	<b>İMZASI</b>	<b>TARİH</b>
<b>Feza KORKUSUZ</b>		<b>26 Kasım 2001</b>

Tablo 2. PHBV matrislerinin 180 günlük degradasyon süresince kalınlık ölçümleri

<b>Degradasyon Süresi (Gün)</b>	<b>Yüklenmemiş PHBV8 Kalınlığı (cm)</b>	<b>Sükroz Yüklenmiş PHBV8 Kalınlığı (cm)</b>
15	2.971±0.012	3.431±0.105
30	3.361±0.023	3.634±0.214
60	3.013±0.020	3.634±0.757
120	3.586±0.056	2.900±0.128
180	3.907±0.044	3.334±0.862

<b>Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı</b>	<b>İMZASI</b>	<b>TARİH</b>
<b>Feza KORKUSUZ</b>		<b>26 Kasım 2001</b>

Tablo 3. Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi.

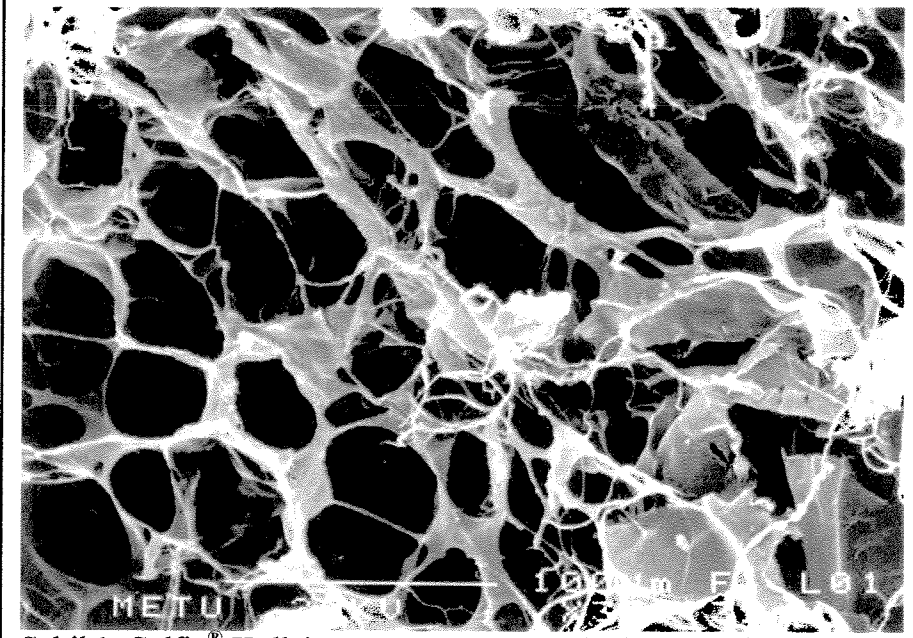
Histopatolojik bulgular	Sekiz Hafta						Yirmi Hafta					
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Epitel Kapanması	++	+	++	++	++	+	+++	++	++	++	++	+++
Kondroid matriks birimi	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	++
Epitel doku gelişimi	+++	+	+++	++	+	+++	-	+++	++	++	++	++
Tamir (var/yok)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Epitel cisim granülasyon dokusu	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	++	-	+++	++
Epitel infiltrat	++	+++	+	+++	+++	-	-	++	+	-	+	+

+++ : Tam, fazla, ileri derecede      ++ : Orta      + : Zayıf, az, hafif      - : Yok

Kondroid matriks gelişimi ve tamir sadece 4 ekstremitede izlendi. Bunların ikisi hücreli ikisi ise hücreli implandlarda gelişmiştir. Diğer ekstremitelerde benzer histopatolojik bulgular saptanmıştır. (Bu nedenle sadece 1A'nın fotoğrafları gönderildi) İncelenen kesitlerde polimere karşı oluşturduğu düşünülen yabancı cisim granülasyon dokusunun baskınlığı izlenmektedir. Kondroid dokuda oluşması gereken tamir süreci istenen boyutta değildir ve hücre ile matriks kombinasyonu ile sadece matriks kombinasyonunun sonuca etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir.

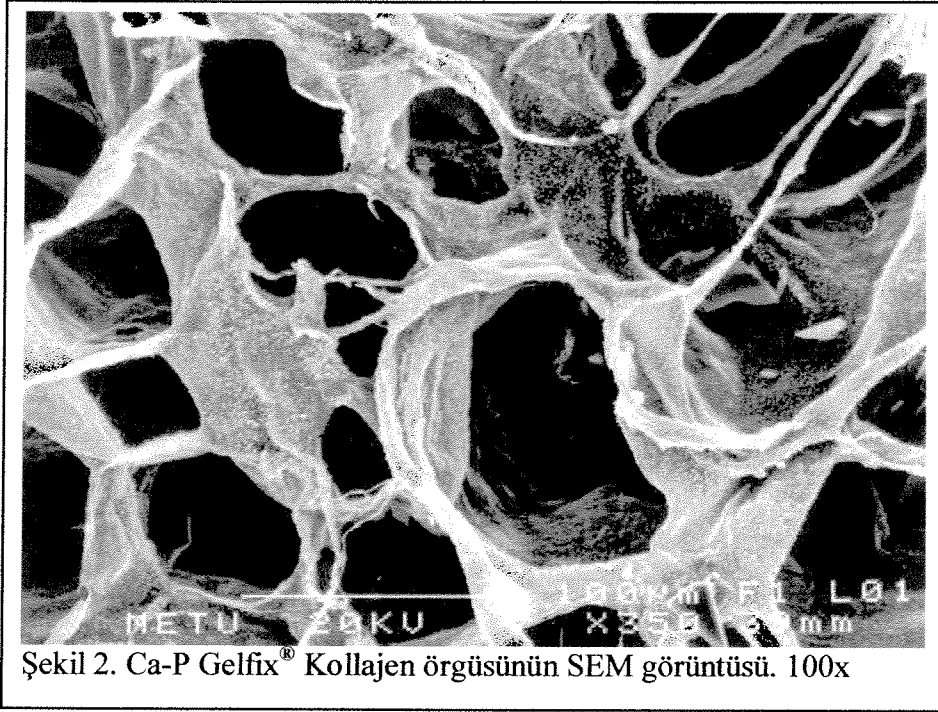
<b>Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı</b>	<b>İMZASI</b>	<b>TARİH</b>
<b>Feza KORKUSUZ</b>		<b>26 Kasım 2001</b>



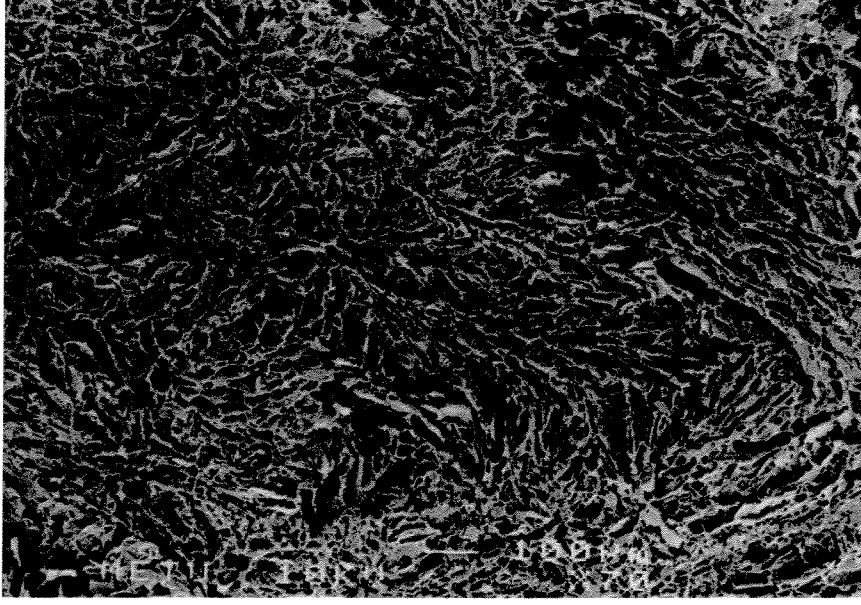


Şekil 1. Gelfix® Kollajen örgüsünün taramalı electron mikroskopta görüntüsü. 100x

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

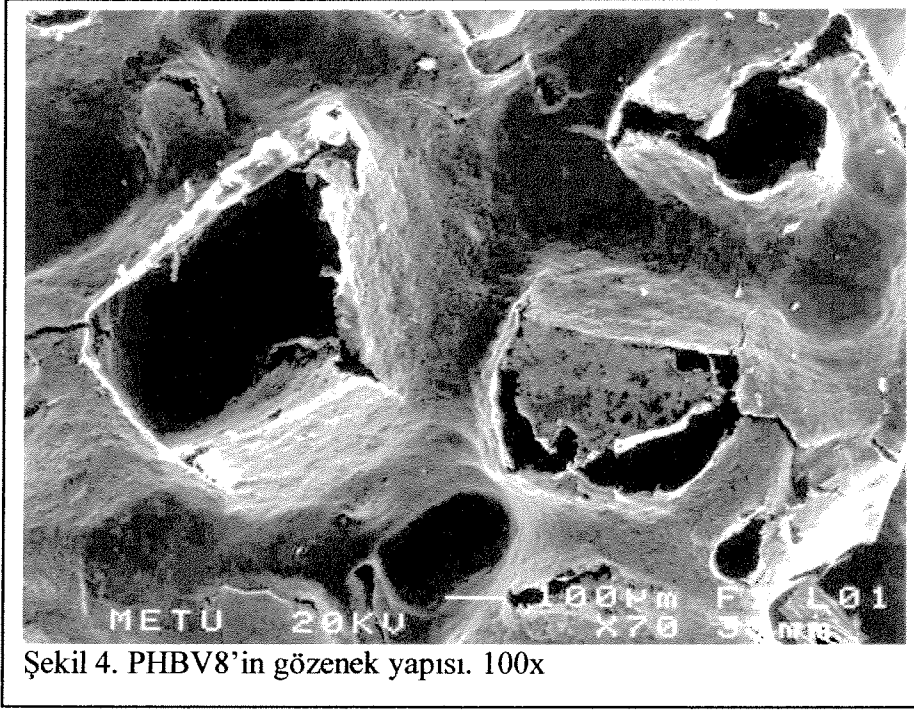


Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

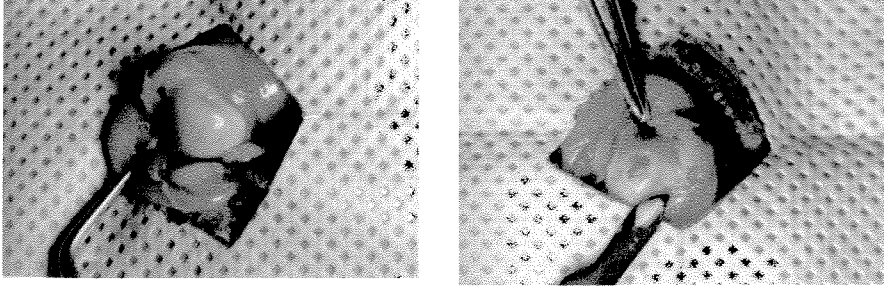


Şekil 3. PHBV8'in SEM görüntüsü. 100x

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

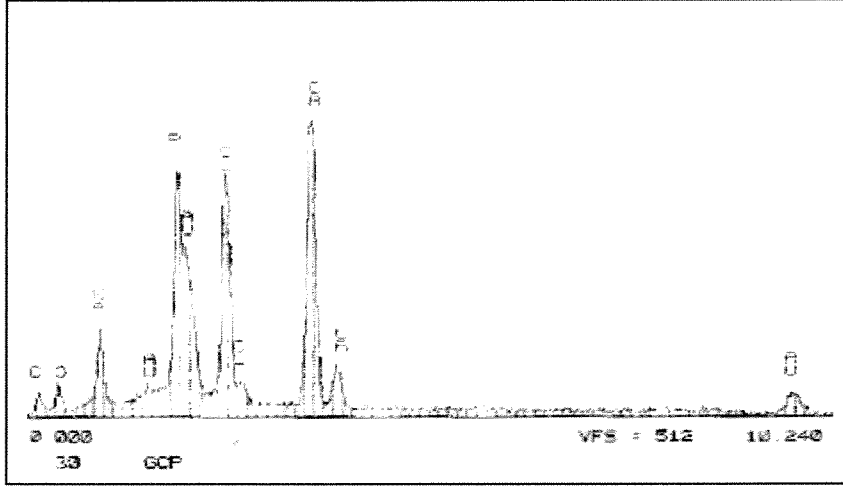


Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



Şekil 5. Tavşanların omuz eklemlerinden kıkırdak dokusunun alınması.

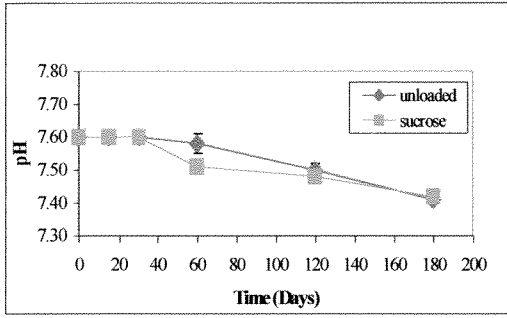
Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



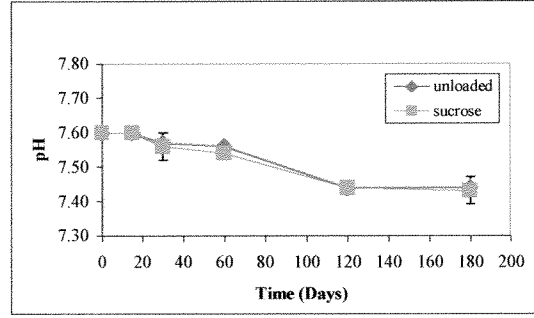
Şekil 6. Ca-P Gelfix matriksinin yapısındaki kalsiyum ve fosfat oranları.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

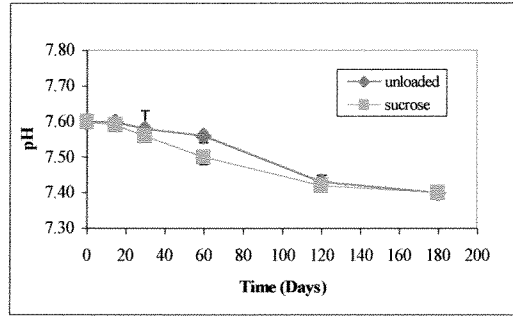
# TÜBİTAK ARAŞTIRMA-GELİŞTİRME PROJESİ KESİN RAPOR



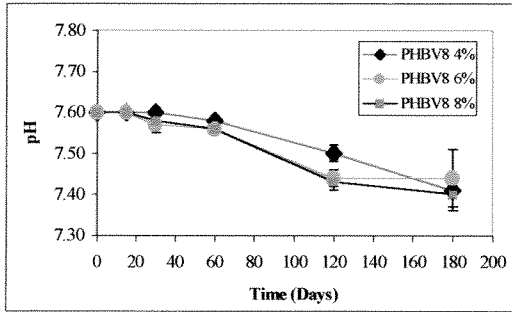
(a)



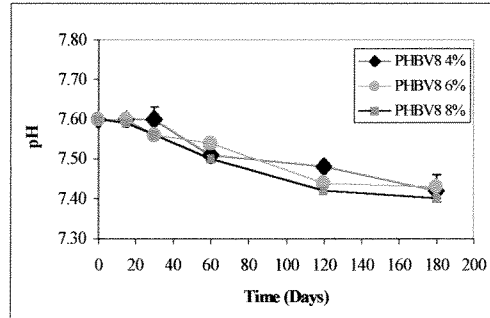
(b)



(c)



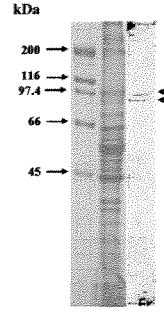
(d)



(e)

Şekil 7. PHBV 8 matrislerinin degradasyonu sonucunda oluşan ortam pH değişiklikleri : a) 4 %, b) 6 %, c) 8 %, d) yüklenmemiş PHBV8, e) sükrözose yüklenmiş PHBV8.

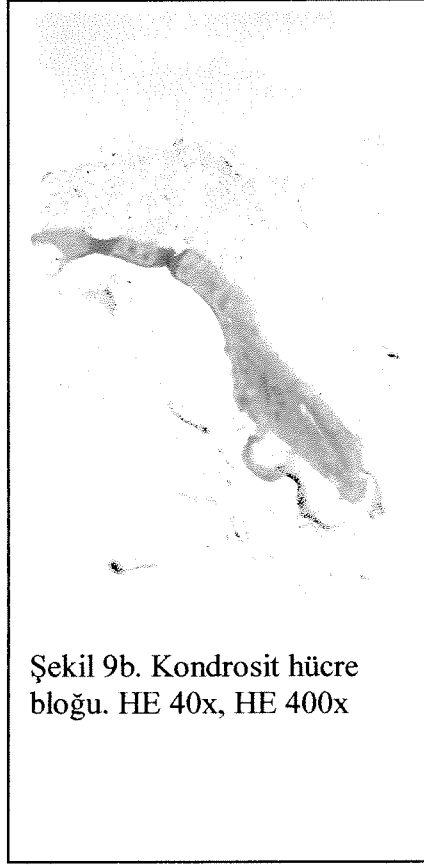
Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



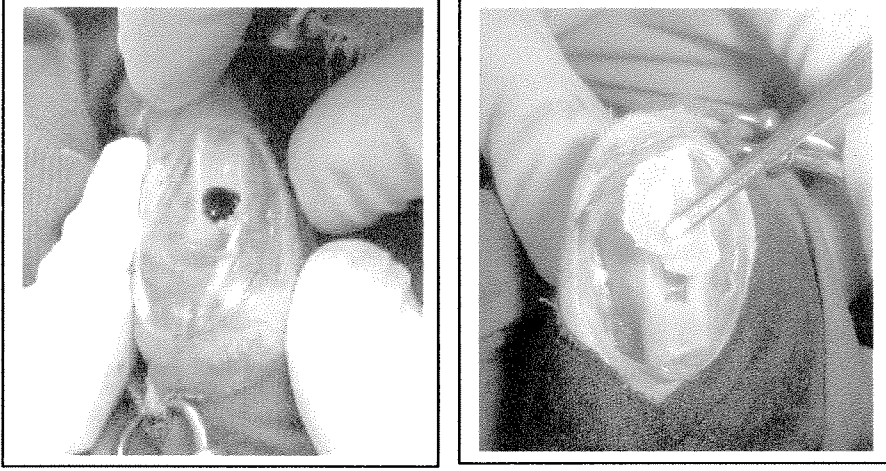
Şekil 8. Kondrositlerin tip 2 kollagen sentezlemedesinin Western Blot yöntemiyle saptanması.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



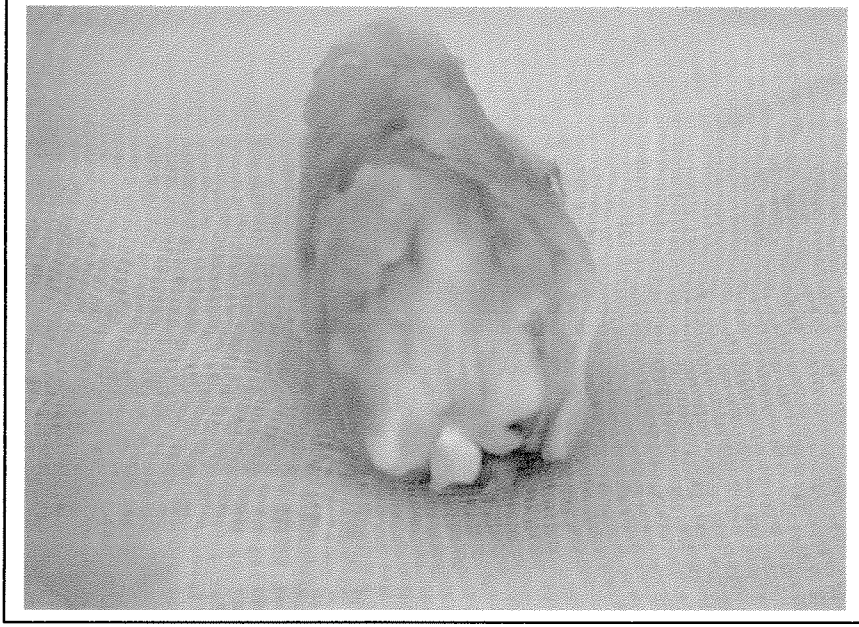


Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



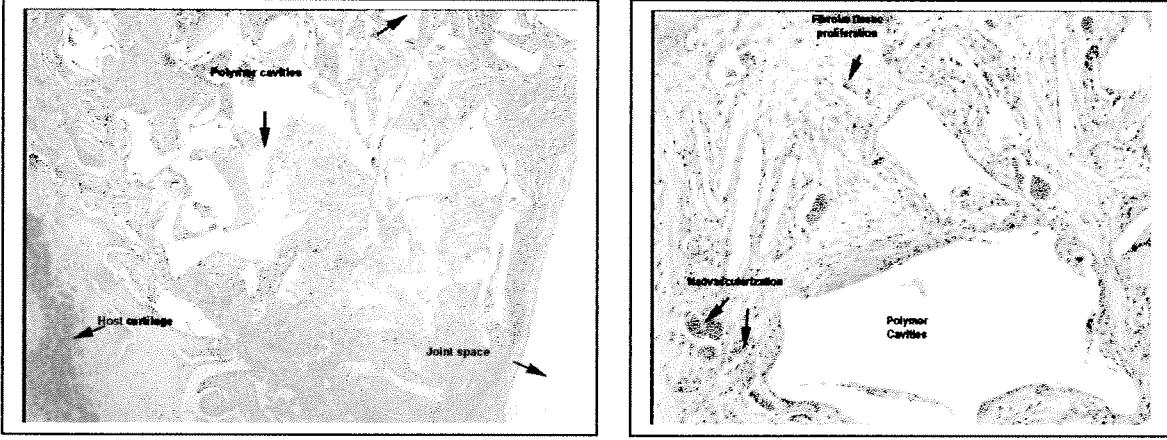
Şekil 10. Kıkırdak defektin oluşturulması (a) ve yapay ağın yerleştirilmesi (b).

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



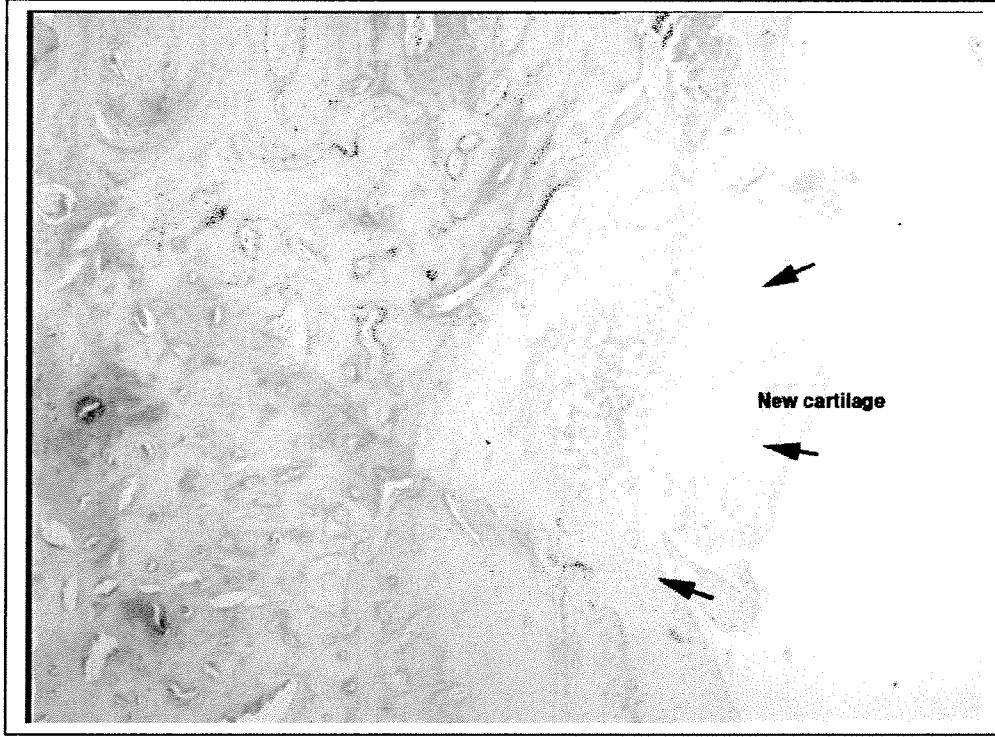
Şekil 11. Yapay ağ ve hücrelerin birlikte uygulandığı bölgede tama yakın kapanma.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



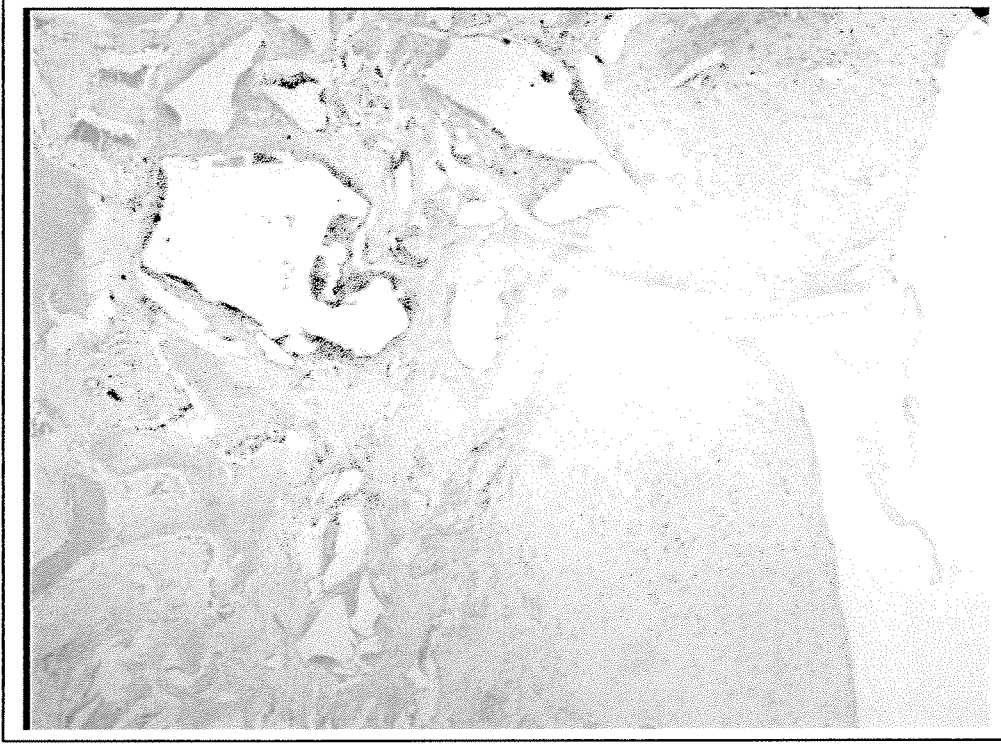
Şekil 12. Sekiz haftalık takipte polimer çevresinde fibröz doku, minimal yabancı cisim reaksiyonu ve neovaskülarizasyon oluşumu gözlenmektedir. HE 25x ve 100x.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



Şekil 13. Sekiz haftada gözlenen kondrogenez. HE 25x.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001



Şekil 14. 20 haftalık takipte hücre içeren ağın içerisinde yeni kıkırdak oluşumu. HE 25x.

Proje Yürütücüsünün Adı-Soyadı	İMZASI	TARİH
Feza KORKUSUZ		26 Kasım 2001

## PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: **MISAG 158**

Proje Başlığı: **YAPAY KIKIRDAK OLUŞTURULMASINDA ÜÇ BOYUTLU BİYOPOLİMERİK YAPILARIN KULLANILMASI**

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Yürütücü: Prof. Dr. Feza Korkusuz

Araştırmacılar: Prof. Dr. Vasıf Hasırcı, Y. Doç. Dr. Cemil Yıldız, Dr. Gamze Köse, Doç. Dr. Muhterem Bahçe, Doç. Dr. Hasan Bilgili, Dr. Yasemin Soysal

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Beden Eğitimi ve Spor Bölümü ve, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Araştırma Birimi, 06531, Ankara; Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Etlük 06018, Ankara; Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dışkapı, Ankara

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

ODTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Araştırma Birimi, 06531, Ankara; Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Etlük 06018, Ankara; Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dışkapı, Ankara

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Eylül 2000 – 1 Mart 2002

Öz (en çok 70 kelime):

Sınırlı iyileşme yetisi olan eklem kıkırdagının yaralanmalarında doku mühendisliği ürünü olan yapay ağların kullanılması güncel araştırma konularındandır. Bu çalışmayla kondrositlerin üzerinde üreyerek yaşayabileceği kalsiyum fosfat içeren kollagen ve Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV8, % 8 HV İçeren PHBV)'den süngersi ağlar üretilmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. 20 hafta takip edilen polimer kompozitlerin çok az yabancı cisim yanıtı oluşturduğu ve kıkırdak iyileşmesini sağlayabildikleri gözlenmiştir. Üretilen polimer ağların gelecekte insanların kıkırdak yaralanmalarında kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

Kıkırdak, doku mühendisliği, kollagen, polimer, hücre kültürü, kondrosit

Projeden Kaynaklanan Yayınlar:

1. Torun-Köse G, Korkusuz F, Hasırcı V. Poly(3-Hydroxybutyric Acid-CO-3-Hydroxyvaleric Acid)(PHBV) based tissue engineering matrices. NATO/ASI Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration. October 15-25, 2002, Algave, Portekiz (pp: 50)
2. Torun-Köse G, Korkusuz F, Hasırcı V. Bone generation via tissue engineering. 17<sup>th</sup> European Society for Biomaterials Conference, September 11-14, Barcelona, İspanya (pp: P238) (poster)
3. Torun-Köse G, Korkusuz F, Özkul A, Ber S, Kenar H, Hasırcı V. Kollajen-PHBV ve doku mühendisliği kullanılarak kemik yapımı. 8. Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Simpozyumu (BİYOMED 8). 5-8 Eylül 2001, Ankara (Poster) (Technology and Health Care 2002;10:299-301'de yayımlanmıştır)

Bilim Dalı: Sağlık Bilimleri-Ortopedi ve Travmatoloji; Fen Bilimleri ve Matematik-Biyoloji;

Doçentlik Bilim Dalı Kodu: 1046; 203