

**Kemik Ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Yağ
Dokusundan Farklılandırılmış Hücre Ve Seramik/Polimer
Kompozit İçeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi**

Proje No: 106M063

Prof.Dr. Abdullah ÖZTÜRK
Prof.Dr. Muharrem TİMUÇİN
Prof. Dr. Erdal BAYRAMLI
Prof. Dr. Feza KORKUSUZ
Prof. Dr. Semra KAHRAMAN
Doç. Dr. Petek KORKUSUZ
Y.Doç. Dr. Caner DURUCAN
Zafer Nihat CANDAN

MAYIS 2008
ANKARA

ÖNSÖZ

“Kemik ve kıkırdak dokusu onarımına yönelik olarak yağ dokusundan farklılandırılmış hücre ve seramik/polimer kompozit içeren yapay dokuların geliştirilmesi” başlıklı proje Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nin (ODTÜ) Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Kimya Bölümü ve Sağlık ve Rehberlik Merkezi, İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikler (YÜT) Merkezi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD'nin işbirliğinde gerçekleştirilmiştir. Disiplinlerarası nitelikteki bu projeye Gamet Medikal Hizmetler AŞ ve Fame-Med AŞ aynı destek, TÜBİTAK maddi destek sağlamıştır.

Eklem içi kıkırdak defektlerinin onarımına yönelik her yıl ABD'de 1.000.000'un üzerinde cerrahi girişim gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde başta spor yaralanmaları olmak üzere kıkırdak defekti olgusunun yılda 220.000 civarında olacağı öngörülmektedir. Son yıllarda kıkırdak defektlerinin onarımına yönelik otolog/kök hücre aktarımı, sinyal moleküllerinin uygulanması ve yapay ağ kombinasyonlarının klinik çalışmalarında kullanımı gittikçe artan oranlarda kullanılmaya başladığı görülmektedir. Otolog kondrosit implantasyonu (ACI) veya transplantasyonu (ACT) olarak adlandırılan ve sadece kişiden alınan kondrositlerin tekrar aynı kişiye uygulandığı girişime ait yurt dışında kısa ve orta dönem sonuçları yakın geçmişte yayınlanmıştır. ACI ile yapay ağın birlikte uygulandığı (MACI) tekniği ülkemizde de tanıtılmaktadır. Çoğunluğu yurt dışı kaynaklı olan kıkırdak doku mühendisliği ürünleri başta pahalı olmalarının yanısıra dokunun yurt dışına gidip gelmesi gibi kanuni zorlukları da beraberinde getirmektedir.

Gerçekleştirilen projede yağ dokusundan kıkırdak hücrelerine farklılandırılan hücreler ile seramik/polimer kompozit biyomalzeme birleştirilmiştir. Eklem kıkırdağını örnekleyen bölgede polimer ve subkondral kemiği örnekleyen bölgede biyoseramik kullanılmıştır. İmplantın eklem yüzeyine bakan bölgesinde yağ dokusundan kıkırdak hücrelerine farklılandırılan hücreler polimerle birleştirilmiştir. Bu hücrelerin gelişimi incelenmiş ve malzeme ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Kondral/subkondral bölge bileşkesi geçirgenliği olmayan UHMWP ile ayrılmıştır. Böylece kemik iliğinden eklem aralığına bağ dokusu geçişi önlenmeye çalışılmıştır. Projede ayrıca subkondral kemiği örnekleyen seramiğe makro kanallar açılarak ve sinyal molekülleri kullanılarak kan damarlarının ilerlemesi sağlanmıştır. Proje kapsamında yapılan araştırmalar sonucunda 3 fazlı yapay kıkırdak elde edilmesi doğrultusunda önemli bulgular derlenmiştir.

Toplumumuzda kıkırdak yaralanmaları ve hastalıklarının tedavisine çözüm getirecek doku mühendisliği kavramının öne çıktığı projenin sonuçlarından yeni bilgi üretmesinin yanısıra yüksek teknolojik değeri olan ve ülkemizin uluslararası alanda rekabet gücünü arttıracak ürün eldesi beklenmektedir. Yukarıda belirtilen sanayi desteği de bu potansiyelin göstergesidir. Bu bağlamda TÜBİTAK'a verdiği nakdi destekten dolayı teşekkür ediyorum. Ayrıca, projenin yürütülmesinde, başarıyla sonuçlandırılmasında emeği geçen başta projenin araştırma ekibini oluşturan Prof. Dr. Muharrem Timuçin, Prof. Dr. Erdal Bayramlı, Prof. Dr. Semra Kahraman, Prof. Dr. Feza Korkusuz, Doç. Dr. Petek Korkusuz, Y. Doç. Dr. Caner Durucan ve Zafer Nihat Candan olmak üzere isimlerini bu satırlarda yazamadığım fakat onların katkısı olmadan bu araştırmanın tamamlanmasının mümkün olamayacağı tüm kişi, kuruluş ve kurumlara da teşekkürü borç biliyorum.

Büyük bir titizlik ve özveriyle yürütülen bu araştırmanın sonuçlarının, başka araştırma geliştirme çalışmalarına ışık tutmasını ve çok işlevli yapay dokuların üretiminin yaygınlaştırılmasına vesile olmasını diliyorum.

Saygılarımla,

Prof. Dr. Abdullah ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	1
Şekillerin Listesi	3
Tabloların Listesi	5
ÖZET	6
ABSTRACT.....	7
GİRİŞ	8
GENEL BİLGİLER.....	18
Projenin Başlangıcındaki Amaçlar.....	19
Projenin Özgün Değeri	20
GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
A. Hidroksiapatit (HAP) ve Trikalsiyum fosfat (TCP) Seramiklerin Hazırlanması	21
B. Seramik İmplantlara Mekanik İşlemlerin Gerçekleştirilmesi.....	23
C. Seramik/Polimer Kompozitlerin Geliştirilmesi.....	24
D. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (kYDKMKH) Çalışmaları.....	25
E. Doku Uyumluluğu Çalışmaları.....	27
BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
A. Hidroksiapatit (HAP) ve Trikalsiyum fosfat (TCP) Seramiklerin Üretimi.....	31
B. Seramik İmplantlara Mekanik İşlemlerin Gerçekleştirilmesi.....	36
C. Seramik/Polimer Kompozitlerin Geliştirilmesi	37
D. PLLA ve PLGA Kaplı Gözenekli Seramiklerin İn Vitro Salım Çalışmaları.....	37
E. Polikaprolakton Polimerinden Elde Edilmiş Ağ Yapılı Sentetik Malzemelerin Mekanik Özellikleri.....	39
F. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (kYDKMKH) Çalışmaları.....	39
G. Doku Uyumluluğu Çalışmaları.....	46
GENEL SONUÇLAR	52
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	54

Şekillerin Listesi

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
1. Normal insan eklemine bileşenleri.....	8
2. Hiyalin eklem kırıkdağını oluşturan hücrelerarası ağ ve kondrositler.....	8
3. Proteoglikanların moleküler yapısı.....	9
4. Sinovyal eklem fizyolojisi.....	9
5. Kırıkdağın temel yapı taşları.	10
6. Cerrahi girişim sonucu gelişen fibröz veya hiyalin kırıkdağ gelişimi.....	11
7. Kırıkdağ doku mühendisliğinde güncel yaklaşım.....	11
8. Hücreler arası ağ ve subkondral kemiği örnekleyen yapay ağlar.....	13
9. Yapay ağlarda aranan özellikler.	13
10. Kırıkdağ onarımında sinyal moleküllerinin doza ve zamana bağlı olası etkileri. (O'Driscoll, 1999'dan değiştirilerek kullanılmıştır.)	14
11. Farklı hücre ve yapay ağ uygulamaları (Martin ve ark. 2007'den örnek alınmıştır).....	15
12. Doku mühendisliği ürünü yapay kırıkdağ.....	21
13. Soğuk basma deneylerinde kullanılan test cihazı.....	23
14. Seramiklere makrokanallar açılırken izlenen süreçler.....	24
15. KYDKMK hücreleri, mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 15 ml'lik konik tabanlı tüp içerisinde kondrojenik farklılaşma sonrası izlenmektedir.....	27
16. KYDKMK hücreleri, mikropellet (micro-mass) yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşma sonrası izlenmektedir. Stereomikroskop, X1,2.....	27
17. Konfokal mikroskop.....	28
18. Konfokal mikroskopta görüntülemenin ilkeleri.....	29
19. Konfokal mikroskopta 3 boyutlu tarama.....	30
20. Elde edilen yapay kırıkdağ ağın makroskopik görünüşü.....	31
21. TCP tipi kalsiyum fosfat bileşimini veren öncül tozun DTA eğrisi.....	32
22. Kalsinasyon sıcaklığına bağlı olarak TCP öncül tozlarında kristal faz oluşumu.....	32
23. TCP ve HAP tozlarına ait XRD kırınım diyagramları.....	33
24. Değişik sıcaklıklarda sinterlenen HAP/TCP karışımlarının SEM fotoğrafları.....	34
25. Gözenekli kompozit seramik örnekleri.....	35
26. Seramiklerin gözenek yapısını gösteren SEM fotoğrafı.....	35
27. Biyomekanik test sonuçları.....	36
28. Seramiklere makrokanallar açıldıktan sonraki görünümü.....	36
29. Silindirik şeklindeki gözenekli seramiklerden salınan deksametazon yüzdesi.....	38
30. Küp şeklindeki gözenekli seramiklerden salınan deksametazon yüzdesi.....	38
31. KYDMKH öncül koloniler, pasaj:0. Kültür kabına tutunan ve tutunmayan hücreler. İnverte mikroskop, X4.....	39
32. KYDMKH ilerleyen kültürlerindeki görüntüsü, pasaj: 3. Hücreler homojen morfolojide ve fibroblastid tipte ve % 95 konfluent. İnverted mikroskop, X10.....	40
33. İzole edip 3-4. pasaja kadar kültüre edilen KYDKMK hücre dizilerinin flow sitometrik analiz ile belirlenen hücre yüzey belirteç ekspresyonları.....	41
34. Mezenkimal kök hücrelere belirli işaretleyicilerden vimentin ile boyanmış KYDKMKH. Yeşil ile boyanan kısımlar sitoplazmik intermediyer filament ekspresyonunu göstermektedir. Floresan mikroskop, X100.....	42
35. KYDKMK hücrelerinde adipojenik farklılaşma sonrasında Oil red-O	

boyanarak hücrelerdeki lipid birikimi gözlenmektedir. İnverted mikroskop, X100.....	42
36. kYDKMK hücrelerinde adipojenik farklılaştırma sonrasında Oil red-O boyanarak hücrelerdeki lipid birikimi gözlenmektedir. İnverted mikroskop, X400.....	43
37. kYDKMK hücrelerinde osteojenik farklılaştırma sonrasında von Kosa boyanarak mineralizasyon gözlenmektedir. İnverted mikroskop, X100.....	43
38. kYDKMK hücrelerinde osteojenik farklılaştırma sonrasında von Kossa boyası ile mineralizasyon gözlenmektedir. İnverted mikroskop, X400.....	44
39. kYDKMK hücreleri, mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşmanın sonunda. İnverted mikroskop, X100.....	44
40. kYDKMK hücreleri, mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşmanın sonunda. İnverted mikroskop, X400.....	45
41. 35 mm'lik petri kabında kondrojenik farklılaştırma uygulanan kYDKMK hücrelerinin oluşturduğu mikropellette Tip II kollajen immunfloresan işaretleme. (→) Okla österilen bölgeler kollajen Tip II bulunun ekstraselüler matriks alanlarıdır. Çekirdek boyası DAPI uygulanmıştır. Fluoresan mikroskop, X100.....	45
42. 35 mm'lik petri kabında kondrojenik farklılaştırma uygulanan kYDKMK hücrelerinin oluşturduğu mikropellette Tip II kollajen immunfloresan işaretleme. (→) Okla gösterilen bölgeler kollajen Tip II bulunun ekstraselüler matrix alanları. Çekirdek boyası DAPI uygulandı. Fluoresan mikroskop, X100.....	46
43. Kondrositlerin sitoplazmaları ve kollajen fibriller pembe, hücre çekirdekleri mor renkte boyanmıştır. Hematoksilen eozin, X400.....	46
44. Kondrositlerin çekirdekleri koyu mor-siyah, ara maddedeki kollajen fibriller yeşil renkte boyanmıştır. Masson trikrom, X400.....	47
45. Kondrositler kırmızı, ekstraselüler matriksteki kollajen fibriller gri-yeşil renkte boyanmıştır. Safranin O, X400.....	47
46. Konfokal mikroskopta biyomalzemeye ait gözeneklerde uzanan çok sayıda hücre ve aralarındaki ekstraselüler matriks izlenmektedir. X100, DiL.....	48
47. Büyük büyütmede konfokakal mikroskopta DiL ile işaretli üç hücre biyomalzeme yüzeyinde sitoplazmik uzantıları ile birbiriyle ilişki halindedir.....	48
48. Transmisyon elektronmikrograflarda mitokondriyonlar yer yer şişmiş görünümündedir. Takip prosedürüne bağlı olarak bazı kondrositlerde hücre zarı erimiştir. Hücreler lizozomlar vezikül ve vakuollerden zengin görünümündedir.....	49
49. Küçük büyütmede biyomalzemenin yüzeyi boyunca tutunmuş yuvarlak hücreler izlenmektedir. X150.....	50
50. Büyük büyütmede malzeme yüzeyine sitoplazmik uzantıları ile tutunmuş ve matriks sentezlemiş yuvarlak kondrositler izlenmektedir. X2000.....	50
51. Biyomalzemenin gözeneklerine oturmuş kondrositler ve yüzeye salgıladıkları ara madde izlenmektedir. X3500.....	51
52. Malzemenin gözenekli mikroyapısı izlenmektedir. X2000.....	51
53. Kıkırdak doku mühendisliğinde başarısızlık nedenleri.....	53

Tabloların Listesi

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
1. Kıkırdak ve kemiğin ayrı örneklendiği doku mühendisliği çalışmaları.....	16
2. Günümüzde klinikte kullanım alanı bulan kıkırdak doku mühendisliği ürünleri.....	17
3. Soğuk basma test sonuçları.....	37

ÖZET

Kemik ve kırık dokularının hastalık veya travmaya bağlı hastalıkları ülkemizin önemli sorunları arasında yer almaktadır. Hastalık veya travma sonucu doku veya organ kayıplarının tedavisinde doku mühendisliği yaklaşımıyla yapay dokuların üretilmesine yönelik deneysel çalışmalar ve sınırlı sayıda da olsa klinik uygulamalar bilimsel alanda yer almaya başlamıştır. Doku mühendisliğinin her üç yapı taşının (biyomalzeme, hücre ve büyüme faktörü) disiplinlerarası yaklaşımla çok merkezli bir çalışma kapsamında ele alınarak kemik ve kırık dokusu eşdeğerinin yapay ortamda örneklenmesi bu çalışmanın temel konusudur.

Bu çalışmanın ilk aşamada sinterlenmiş hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat (HA/TCP) karışımı, eser element destekli, damar geçişine uygun bağlantılı, gözenek boyutları ortalama 700 µm dolayında gözenekli seramikler üretilmiştir. Daha sonra bu seramiklere mekanik işlemlerle makrokanallar açılmıştır. Gözenekler arası kanalların çapları 100 µm ile 400 µm arasında değişmektedir. Seramiklerin mekanik dayanıklılığını arttırmak için büyüme faktörleri ile kombine edilmiş biyobozunur/biyouyumlu polimerlerle güçlendirilmiştir. Biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerin gözenekli seramiğin soğuk basma mukavemetini göreceli olarak 3 katı artırdığı saptanmıştır. Ağ yapılı malzemelerin 2,24 MPa yük altında eğildikleri gözlemlenmiştir. Malzemelerin yük altındaki deformasyonunun ortalama olarak %16 olduğu belirlenmiştir. İkinci aşamada polimerden sinyal molekülünün kontrollü salımı başarılmış ve kırık dokuyu örnekleyecek polikaprolakton geliştirilmiştir. Son olarak, biyomalzemelerle birlikte yağ dokusundan farklılaştırılmış kemik ve kırık hücrelerinin (ADKK) kullanılmasıyla doku mühendisliği son ürünü geliştirilmiş ve bunun in vitro koşullarda uygun yöntemlerle biyouyumluluğu test edilerek doku uyumluluğu kanıtlanmıştır.

ABSTRACT

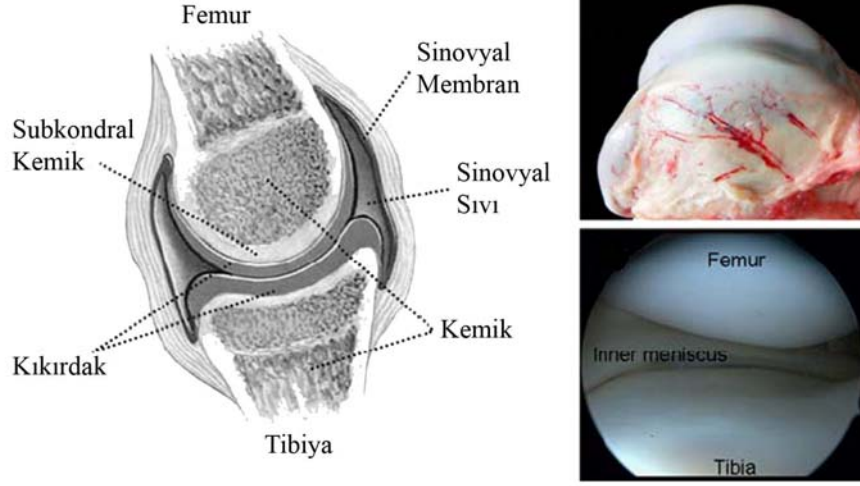
Bone and cartilage diseases and/or trauma are among the most important health issues of Turkey. Recently limited clinical practices and some experimental studies are observed in the literature on tissue engineering approach to treat tissue and organ loss. The main scope of this project is to combine the three corner stones of tissue engineering concept; the biomaterial, the cells and growth factors, to generate bone and cartilage-like tissues by an interdisciplinary and multicenter study.

At the first step of this study; sintered, interconnected-porous, hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) ceramics doped with trace elements were developed. The size of the porosities was 700 μm on the average. Then, macrochannels were opened in these ceramics by mechanical processes. Diameter of the macrochannels among the porosities ranged from 100 μm to 400 μm . Mechanical manipulation aided tissue ingrowth to these ceramics. Biocompatible and biodegradable polymers were used to improve the mechanical strength of the bioceramics. Biocompatible and biodegradable polymers improved cold compressive strength of the porous ceramics by a factor of 3. Net structured biomaterials were bent at 2.24 MPa. Deformation under loading was 16% on the average. At the second step, a growth factor was added to the polymer to enhance tissue interaction and biocompatibility. A controlled release of signal molecules was managed and cartilage-like polycaprolacton tissues were developed. At the final step, bone and cartilage cells derived from adipocytes were combined with the composites. Cell and growth factor containing composites were tested in vitro and tissue harmoniousness was evidenced.

GİRİŞ

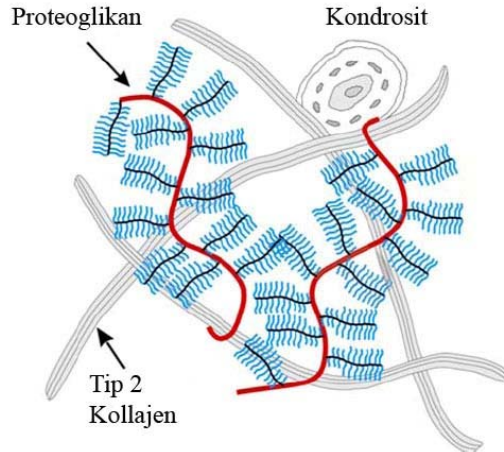
Kıkırdığın Yapısı ve İşlevi

Eklem kıkırdağı insanda hareket işlevini yerine getirmek üzere ileri derecede farklılaşmış bir dokudur. Şekil 1’de normal insan eklemine bileşenleri görülmektedir.

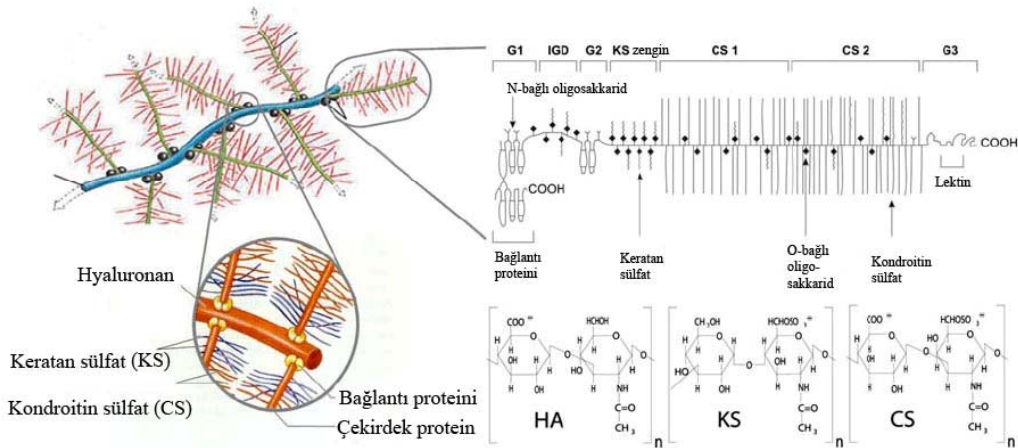


Şekil 1. Normal insan eklemine bileşenleri.

Hiyalin kıkırdak yapısındaki eklem kıkırdağı ağırlıklı olarak tip 2 kollajenden oluşan hücrelerarası ağ (ekstrasellüler matriks) ve kondrositlerden oluşur. Ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlar fibriller ile hücreleri Şekil 2’de görüldüğü gibi birleştirir. Hücrelerarası ağın % 60-85’i su ve elektrolitleri, %10-30’u kollajen ve % 3-10’u proteoglikanları içerir. Proteoglikanlar, hiyaluronan, keratan sülfat (KS), kondroitin sülfat (CS) ve bunları birbirine bağlayan bağlantı proteinlerinden oluşur. Proteoglikanların moleküler yapısı Şekil 3’de görülmektedir. Bu yapıyla eklem kıkırdağı büyük oranda su tutar ve bu suyu kontrollü vererek eklem gelen yükleri soğurur. Aynı zamanda üstün yüzey sürtünmesi özelliği gösteren eklem kıkırdağı uzun yıllar boyu harekete izin verir.



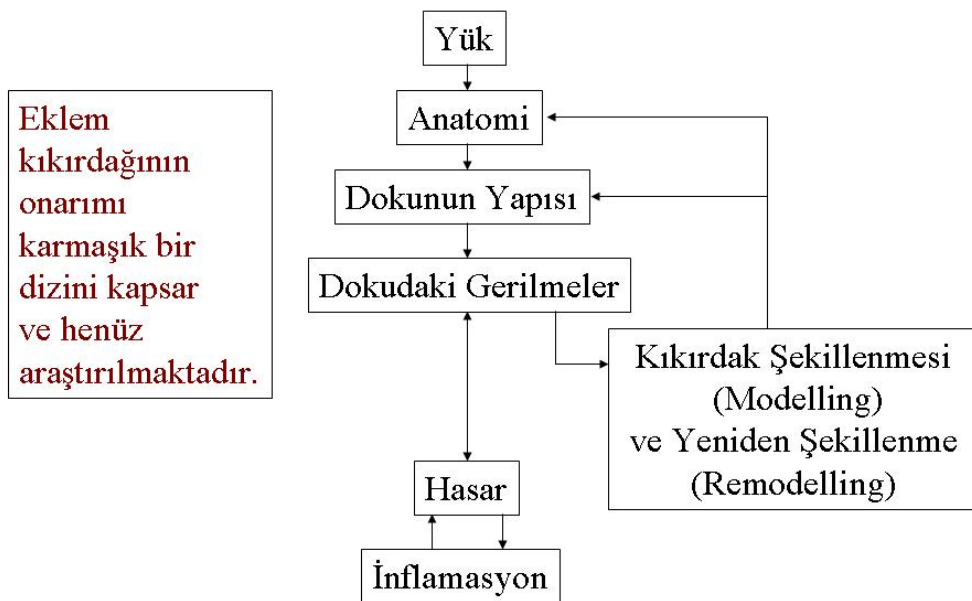
Şekil 2. Hiyalin eklem kıkırdağını oluşturan hücrelerarası ağ ve kondrositler.



Şekil 3. Proteoglikanların moleküler yapısı.

Eklem kıkırdağı, hücreler arası ağı sentezleyen, mezenkimal kondroblastlardan farklı olan kondrosit adı verilen hücreleri içerir. Lakünalarının içine yerleşik kondrositler yukarıda da belirtildiği gibi hücrelerarası ağın içinde seyrek olarak bulunur. Hücre/ağ oranı katmanlarına göre farklılık göstermekle birlikte 1/30 ile 1/100 dolayındadır. Kıkırdak dokusu damar ve sinir içermediğinden perikondrium denen düzensiz sıkı bağ dokusundan beslenir. Ancak eklem kıkırdağı perikondrium içermez. Bunun yerine eklem kapsülünün iç kısmında yerleşik, dinamik bir doku olan sinovyum tarafından desteklenir. Sinovyal hücreler sinovyal sıvıyı sentezleyip salgılar. Eklem kıkırdağındaki kondrositler diğer çoğu dokudan farklı olarak eklem içi (sinovyal) sıvıdan beslenir ve ağırlıklı olarak anaerobik metabolik yolu kullanır (Şekil 4 ve Şekil 5). Bu nedenle kıkırdak yaralandığında kondrositler sınırlı onarım gücü sergiler.

Sinovyal Eklem Fizyolojisi



Şekil 4. Sinovyal eklem fizyolojisi.



Şekil 5. Kıkırdağın temel yapı taşları.

Kıkırdak Onarımı

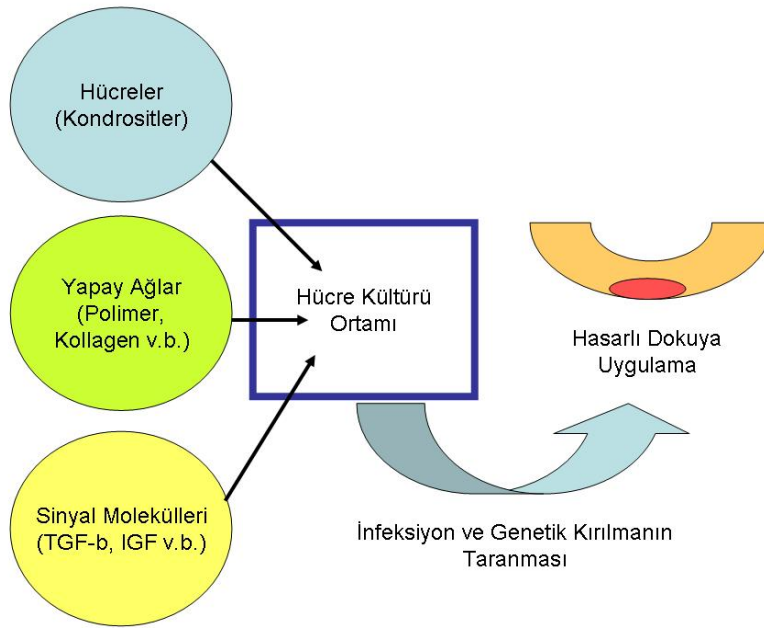
Özellikle çocukluk veya gençlik çağında spora bağlı kıkırdak yaralanmalarının tedavisi kıkırdağın kendini onaramaması nedeniyle sorun oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) bu tür kıkırdak yaralanmalarının tedavisine yönelik yılda 1.000.000 cerrahi girişim gerçekleştirilmektedir (Lynn ve ark., 2004). Nüfusa oranlandığında ülkemizde başta spor yaralanmaları olmak üzere defektle sonlanan ve cerrahi gerektiren kıkırdak yaralanması olgusunun yılda 220.000 dolayında olduğu düşünülmektedir. Zamanında ve doğru tedavi edilmeyen kıkırdak defektinin gelecekte büyük olasılıkla halk arasında kireçlenme olarak adlandırılan osteoartrit (OA) ile sonlanması söz konusudur. Osteoartrit 65 yaş üzeri toplumda iki kişiden birisinde görülmekte olup hekime başvuruyu gerektiren kronik hastalıkların en başında gelmektedir. Osteoartritin önlenmesi, tanısı ve tedavisi (Musculoskeletal conditions) için ve yine bu hastalığa bağlı morbiditenin yıllık bütçesel boyutu birkaç milyar USD'ı bulmaktadır. Yaşlanan toplumla birlikte osteoartrite yakalanma ve bu hastalığa bağlı komplikasyonların yaşanma olasılığının önümüzdeki 10 yılda katlanarak artması söz konusu olduğundan kıkırdak defektlerinin zamanında ve doğru onarımı ikincil OA'in gelişimini önlemede büyük önem kazanmaktadır.

Günümüzde kıkırdak defektlerinin onarımında değişik cerrahi teknikleri kullanılmaktadır. Hiyalin kıkırdak yerine bağ dokusu (fibröz kıkırdak) gelişimini tetikleyen mikrokirik oluşturulması gibi yöntemler gelişmiş ülkelerde yerini ileri teknolojik yöntemlere bırakmaktadır. Cerrahi girişim sonucu gelişen fibröz veya hiyalin kıkırdak gelişimi Şekil 6'da görülmektedir. Subkondral bölgeden kemik iliğine delik açılması veya mikrokiriklerin oluşturulmasıyla defekt bölgesinde fibröz doku gelişmekte ve bu doku normal kıkırdağın yapı ve işlevini yerine getirememektedir. Mozaikplasti adı verilen ve aynı eklem yük taşımayan bir bölgeden alınan normal kıkırdağın defekt bölgesine transplantasyonu başarılı sonuçlar vermekle birlikte büyük defektlerde kullanılamaması ve dokunun alındığı yerde oluşan hasar bu girişimin uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda kıkırdak defektlerinin

onarımında (a) olog/kök hücre aktarımı, (b) sinyal moleküllerinin uygulanması ve (c) yapay ağ kombinasyonları klinik uygulamalarında artan oranlarda kullanılmaya başlanmıştır. Şekil 7 kıkırdak doku mühendisliğinde güncel yaklaşımı göstermektedir.



Şekil 6. Cerrahi girişim sonucu gelişen fibröz veya hyalin kıkırdak gelişimi.



Şekil 7. Kıkırdak doku mühendisliğinde güncel yaklaşım.

Oolog Kondrosit İmplantasyonu/Transplantasyonu

Oolog kondrosit implantasyonu (ACI) veya transplantasyonu (ACT) aynı kişiden alınan kondrositlerin hücre kültüründe çoğaltılarak geriye, kıkırdak defektine uygulandığı girişimlerdir. Oolog kondrosit implantasyonunun ABD'deki uygulama fiyatı 10.000 USD ve Avrupa Birliğindeki uygulama fiyatı da 4.750 EURO dolayındadır. Eğer defekt büyük ve çok hücre kullanılmasını gerektiriyorsa fiyat katlanarak artmaktadır. Bu fiyat sadece ACI/ACT'yi kapsamakta olup hekim, hastane ve rehabilitasyon giderlerinin buna eklenmesi gerekmektedir. Oolog kondrosit implantasyonunun önemli dezavantajlarının başında kıkırdak alınırken ve defekte hücre uygulanırken iki kez aynı eklemeye cerrahi girişim gerektirmesi gelmektedir. Hücrelerin uygulanacağı kıkırdak defekti temizlendikten sonra

kemiği saran periosttan alınan zar defektin eklem yüzüne bakan bölgesine dikilmektedir. Kondrojenik ve osteojenik potansiyeli olduğu bilinen (Gallay ve ark., 1994; Nakahara, 1991) periostun kendisi de kırıkta yapabilmektedir. Periost dokusu kırıkta dikildikten sonra çevresinden hücrelerin dışarı sızması için fibrin yapıştırıcı kullanılmaktadır. Açık eklem cerrahisi gerektiren ve oldukça karmaşık olan ACI girişiminin diğer önemli dezavantajları

- (a) fazla sayıda hücre gerektirmesi,
- (b) pahalı olması ve
- (c) eklem dışı periost dokusunun kullanılması (bu nedenle başka bir vücut bölgesinde de cerrahi yapılması) gelmektedir.

Otolog kondrosit implantasyonunun uygulanmasının sakıncalı olduğu koşulları

- (a) Osteoartrit,
- (b) Bipolar kondral yaralanmalar,
- (c) Eklem aralığında daralma,
- (d) Osteofit formasyonu,
- (e) Subkondral kemikte skleroz ve
- (f) Kist formasyonu oluşturmaktadır. Otolog kırıkta implantasyonundan üç ay sonra implantasyon bölgesinde hiyalin kırıkta oluşumunun iki kat arttığı, ancak bu artışın periost dokusu implantasyonu veya kontrol grubuna oranla anlamlı farklı göstermediğini belirten bir çalışma (Breinan, 2001) bulunmaktadır. Peterson ve arkadaşları, 2002 ACI'ye ait orta ve uzun dönem sonuçlarını yayınlamıştır. Patella veya femoral kırıkta yaralanma bölgesine ACI uygulanan hastalar ortalama 7,4 yıl (5-11) takip edilmiştir. İki yılın sonunda 61 hastanın 50'sinde başarılı sonuç elde edildiği, ikinci bakış artroskopide elektromekanik indentasyon probuyla muayenede normal kırıkta % 90'ına ulaşan mekanik sağlamlığın olduğu, 12 biyopsi örneğinden sekizinde Safranin-O ile boyanmanın gerçekleştiği ve sekiz hiyalin biyopsi örneğinin 3'ünde tip 2 kollagen geliştiği saptanmıştır. Browne ve arkadaşlarının, 2005 gerçekleştirdiği çok merkezli kohort çalışmada hastalar 5 yıl süre ile takip edilmiş ve Cincinnati skorlamasına göre değerlendirilmiştir. Yaş ortalaması 39, defekt boyutu ortalaması 4.9 cm² olan ve önceden geçirilmiş en az bir başarısız kırıkta onarımı bulunan 87 hastada ortalama 2,6 puan iyileşme görülmüştür. 62 hastada iyileşme görülürken 19 hastada kötüleşme gözlenmiştir. İyileşme gözlenen grupta puan artışı 4,1 olarak kaydedilmiştir. Mithöfer ve arkadaşları, 2005 ACI uyguladıkları 45 futbolcuyu 41±4 ay takip etmiş ve % 72 başarılı sonuç ile % 83 oranında futbola dönüş bildirmişlerdir. Otolog kondrosit implantasyonu kullanılan kırıkta onarımı süreçlerinde karşılaşılan sorunlar

- (a) Farklanmada yetersizlik,
 - (b) Hücre kaybı,
 - (c) Matriks çözünmesi ve
 - (d) İntegrasyon eksikliği
- olarak nitelendirilmiştir (Steinert ve ark., 2007).

Yapay Ağlar

Kırıkta defektlerinin onarımında yapay ağlar (matriks) tek başına nadiren kullanılmaktadır. Buna karşın hücrenin taşınması ve defekt bölgesinde tutulması için kullanılacak yapay ağların

- (a) gözenekli,
 - (b) hücre ile uyumlu,
 - (c) kendiliğinden eriyebilen (biyobozunur),
 - (d) esnek,
 - (e) ucuz ve
 - (f) cerrahi sırasında kolay uygulanabilir olması
- beklenmektedir (Hunziker, 1999; Yaylaoğlu ve ark., 1999; Boland ve ark., 2007). Hücreler arası ağı ve subkondral kemiği örnekleyen yapay ağlar ve yapay ağlarda aranan özellikler sırasıyla Şekil 8 ve Şekil 9'da verilmektedir.

Yapay Ağlar*

- Kalsiyum Fosfat
 - HA/TCP
- Biyolojik Polimerler
 - Kollagen/GAG; Aljinat; Hyaluronan; Kitosan
- Sentetik Polimerler
 - PLA; PGA; PCL; PHBV
- Diğerleri
 - Demineralize kemik matriks; Devitalize kırıkta; Periost; Biyocam

*Hücrelerarası (Ekstraselüler) ağı örnekler.

Şekil 8. Hücreler arası ağı ve subkondral kemiği örnekleyen yapay ağlar.

Yapay Ağlar

- Biyolojik olarak uyumlu (normal fizyolojik süreçleri olumsuz etkilemeyen),
- Normal hücre büyümesine ve farklılaşmasına izin veren,
- Üç boyutlu yapısını yeterli süre koruyan,
- Biyolojik olarak çözünebilen (degradasyon-abzorbasyon-integrasyon),
- Toksikitesi ve immunjenitesi düşük,
- Üretim süreci belirlenmiş, ucuz ve kolay,
- Cerrahi sırasında boyutu ve şekli kolay uyarlanabilir.
- **Üç boyutlu hücrelerarası ağı ve hücreler arasında dinamik etkileşimin (integrinler) yanısıra iç ve dış etmenlerin karşısında denge korunmaktadır.**
- **Kırıkta ve altındaki subkondral kemiğin yapısını ayrı ayrı örnekleyebilen iki fazlı malzemeler.**

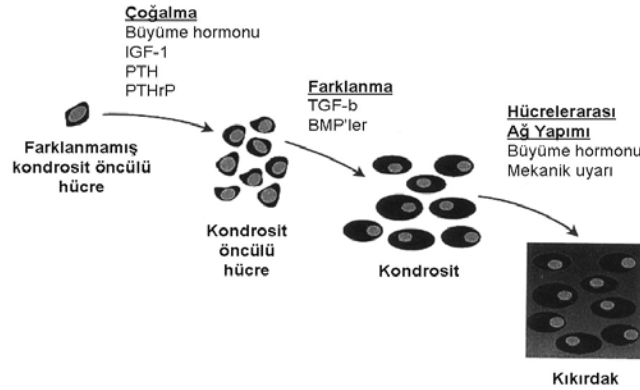
Şekil 9. Yapay ağlarda aranan özellikler.

Yapay ağların üretiminde farklı teknikler kullanılmakta olup başlıca yöntemler

- a) Fibril bağlama,
 - b) Sıvı kalıplama ve partikül uçurma,
 - c) Membran laminasyonu,
 - d) Eriterek dökme,
 - e) Ekstrüzyon,
 - f) Dondurup kurutma,
 - g) Faz ayrıştırma,
 - h) Doğal polimerler,
 - i) Bağ doku kapsülü,
 - i) Hızlı prototipleme ve
 - j) Electrospining
- olarak belirtilmiştir.

Sinyal Molekülleri

Sinyal molekülleri kıkırdak defektlerinin onarımında tek başına kullanılmamaktadır. Bunlar çoğunlukla yapay ağlarla birlikte kıkırdak defektine uygulanmaktadır (Lee ve Shin, 2007). Sinyal moleküllerinin en önemli dezavantajları doz ve zamana bağlı farklı etki göstermeleridir. Bu durum Şekil 10'da görülmektedir.

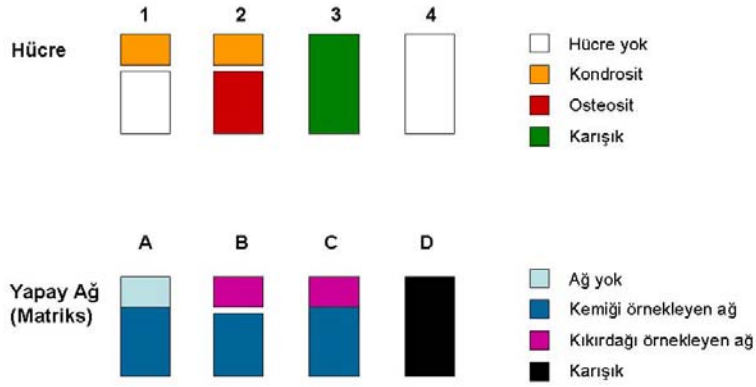


Şekil 10. Kıkırdak onarımında sinyal moleküllerinin doza ve zamana bağlı olası etkileri (O'Driscoll, 1999'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

Bu nedenle hangi sinyal molekülünün hücre/doku oluşumunun hangi aşamasına hangi dozda etki ettiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Kıkırdak Doku Mühendisliği

Yukarıda değinilen çalışmalar ve Martin ve arkadaşlarının, 2007 kıkırdak doku mühendisliğinde olası yapay ağ ve hücre stratejileri Şekil 11'de özetlenmiştir. Bu çalışmaya göre hücre ve yapay ağların farklı kombinasyonları söz konusudur. Stratejinin en önemli eksikliği sinyal moleküllerine yer verilmemiş olmasıdır.



Şekil 11. Farklı hücre ve yapay ağ uygulamaları (Martin ve arkadaşları, 2007'den örnek alınmıştır).

Yapay ağların kullanıldığı çalışmalarda kıkırdak ve kemik dokunun ayrı ayrı örneklenmesi önem arz etmektedir. Kıkırdak ve kemiğin ayrı örneklendiği doku mühendisliği çalışmaları Tablo 1'de özetlenmiştir.

ACI ile yapay ağın birlikte uygulandığı MACI tekniği ülkemizde klinik alana yeni tanıtılmaktadır. Koyunlarda gerçekleştirilen deneylerde MACI tekniği ile iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir (Jones ve ark., 2008). Yöntemin uygulandığı 12 insanda da yüz güldürücü sonuçlar alınmıştır (Gigante ve ark., 2007). Başka bir çalışmada beş yıl süre ile takip edilen 25 hastanın büyük çoğunluğunda eklem işlevi normale dönmüştür (Behrens ve ark., 2006). Çoğunluğu yurt dışı kaynaklı ve pahalı olan kıkırdak doku mühendisliği ürünleri ayrıca dokunun yurt dışına gidip gelmesi gibi kanuni zorlukları da beraberinde getirmektedir. Günümüzde ticari olarak bulunabilen kıkırdak doku mühendisliği ürünleri ve uyguladıkları stratejiler Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 1. Kıkırdak ve kemiğin ayrı örneklendiği doku mühendisliği çalışmaları.

Kıkırdak kompartman	Kemik kompartman	Uygulama yöntemi	Uygulama bölgesi	Hücre türü	Mediatör	Kaynakça
PLGA	Biyocam	Çözücüyle kaynaştırma	Femoral medial kondil/Patella	Otolog kondrosit	-	Nideraurer ve ark., 2000
PLGA	Kalsiyum sülfat	Çözücüyle kaynaştırma	Femoral medial kondil/Patella	Otolog kondrosit	-	Nideraurer ve ark., 2000
Hyaluronan	Kalsiyum fosfat	İnfiltrasyon	Femoral medial kondil	Kİ kökenli progenitör hücre	-	Gao ve ark., 2002
PGA	Kollagen/HA/TCP	Dikiş	Femoral kondil-patellar yüz	Allojen kondrosit/Otojen Kİ hücresi	-	Schaeffer ve ark., 2002
PGA	PLGA/PEG	Dikiş	Hücre kültürü	Kondrosit /Periosteal hücre	-	Schaeffer ve ark., 2000
PLA/PLGA	PLA/PLGA/TCP	Çözücüyle kaynaştırma	Kondrosit kültürü	Kondrosit	-	Scherwood ve ark., 2002
Hyaluronan	HA/TCP	Doku yapıştırıcısı	Cilt altı dokusu	Mezenşimal kök hücre	TGF-beta	Gao ve ark., 2001
Agaroz	Deselülarize kemik	İnfiltrasyon	Otolog kondrosit	Otolog kondrosit	-	Hung ve ark., 2003
Jelatin/fibrin	Jelatin/fibrin	-	Femoral kondil	-	TGF-beta/IGF-1/suramin	Hunziker ve Diresang, 2003

Tablo 2. Günümüzde klinikte kullanım alanı bulan kırık doku mühendisliği ürünleri.

Ürün	Malzeme	Hücre Kaynağı	Kültür/Gün (D)	Ürün boyutu (mm)	Yükseklik (mm)
CaReS	Kollagen Tip 1	Otolog	10-14 (3D)	35 (çap)	Değişken
MACI	Kollagen Tip 1	Otolog	14 (2D) 7 (3D)	40x50	1
Hyalogaft-C	HA	Dana	14 (2D) 15 (3D)	100 mm ²	1
Bioseed C	Polimer/Fibrin	Otolog	10 (2D) 5-7 (3D)	30x20	1,5
Novocart	Kollagen Tip 1+ CS	Otolog	8-9 (2D) 8-9 (3D)	30x50	1,5
Arthromatrix	Kollagen Tip 1	Otolog	28-56 (2D)	70x30	1

Varsayımlar

Gerçekleştirilen literatür taraması ve daha önceki araştırmaların ışığı altında projenin başlangıcındaki varsayımları maddeler halinde aşağıda verilmiştir:

- Cam fazı eşliğinde sinterlenmiş HA/TCP (60/40) gözenekli seramikler subkondral kemiği örnekleyecektir,
- Seramiklerin mikro mekanik manipülasyonu yapay ağa hücre girişini arttıracaktır,
- Seramiğin gözeneklerinin polimerle kaplanması subkondral kemiğin organik yapısı olan kollajeni örnekleyecek ve yapay ağın torsiyonel yüklerde mekanik dayanıklılığını arttıracaktır,
- Polimere büyüme faktörlerinin eklenmesi osteointegrasyonu hızlandıracaktır,
- Kırık doku ekleme bakan yüzeyini örneklemek için adipöz doku kaynaklı kök hücre (ADKK) polimer ağ ile birleştirecektir ve
- Geliştirilecek mühendislik ürünü yapay kırık doku eklem onarımında kullanılabilir.

GENEL BİLGİLER

Kas-iskelet sisteminin temel işlevi yaşamın en önemli belirleyicilerinden olan hareketi sağlamaktır. Sinovyal eklem bu sistemin hareketle ilgili en önemli bileşenidir. Eklem örneklenirken çoğu güncel yaklaşım sadece kıkırdağa odaklanmaktadır. Son zamanlarda kıkırdağın eklem bakan yüzü kadar subkondral kemiğin de önemli olduğuna ve doku mühendisliğinde bu bileşenin de örneklenmesinin gerektiği belirtilmektedir. Subkondral kemiğin örneklenmesinde kalsiyum fosfat bazlı seramikler kullanılmaktadır. Hidroksiapatit (HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP) olarak adlandırılan seramiklerin kemiğin mineral yapısını örneklediği bilinmektedir. Hidroksiapatit ve TCP seramikler tek başına kullanılabilirdiği gibi polimerlerle birleştirilerek kompozit şeklinde de kullanılabilir.

ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünde kemik yerine kullanılabilir HA ve TCP seramiklerin geliştirilmesi üzerinde son 10 yıldır araştırmalar sürdürülmektedir. Araştırmaların sonucunda gözenekli HA ve HA/TCP (60/40) seramikler elde edilmiştir (Taş ve ark., 1997; Koç ve ark., 2004; Koç ve ark., 2004). Bu seramikler deneysel amaçlarla kullanılmış ve doku etkileşimleri açısından başarılı sonuçlar alınmıştır (Cenk, 2007).

Gözenekli HA ve HA/TCP (60/40) seramik bloklar deneysel çalışmalarda kemiğe uygulandığında gözeneklerin içine dokunun periferden merkeze doğru ilerlediği ve seramiğin merkezinde kalan alanlarda kemikleşmenin geç ve güç olduğu görülmüştür. Bu bağlamda seramiklerin mekanik özelliklerini bozmadan mikro mekanik manipulasyonla hücre girişini arttıracak yaklaşımın başta seramik içerisinde kan dolaşımını arttıracığı buna paralel olarak da kemik dokuya entegrasyonun hızlanacağı ön görülmüştür.

HA ve HA/TCP (60/40) seramiklere aktif madde ve büyüme hormonları eklenerek osteointegrasyonun hızlandırılması önemlidir. TÜBİTAK SBAG-2521 "Segmenter kemik defektlerinde endotelin 1 içeren hidroksiapatit seramiklerin kullanılması." başlıklı projede HA ve HA/TCP (60/40) seramiklerle endotelin-1 taşınmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Kerman ve ark, 2007). Bu çalışmada seramiklerin büyüme hormonlarının taşınmasında kullanılabilirdiği ve bunun osteointegrasyonu hızlandıracağı belirlenmiştir.

Kemikte bulunan bazı eser elementlerin yapısal işlevde önemli görev alabileceği bilinmektedir (Aras ve ark., 1999). Kemiğin uzaysal diziliminde yapıyı korumakla görevli olduğu düşünülen eser elementlerin seramiğin yapısına katılmasına yönelik çok az çalışma bulunmaktadır (Aras ve ark., 2000).

Kıkırdak ve subkondral kemiğin hastalığı/kaybı da kemik hastalıkları ve kayıpları gibi önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Osteoartritle sonlanan hastalıkların çoğu travma, osteokondritis dissekans veya subkondral bölgede osteonekroz sonucu oluşmaktadır. Bu defektlerin onarımında farklı cerrahi ve biyolojik temelli tedavi yöntemi bulunsa da iyileşme çoğunlukla fibröz kıkırdakla olmaktadır. Sınırlı ölçüde kullanılan ve oldukça pahalı bir yöntem olan otolog kıkırdak onarımının erken sonuçları başarılı bulunmakla birlikte bu yaklaşımda kıkırdak dokusundan hücre eldesine gidildiğinden cerrahi ve teknik zorlukları vardır. Otolog kıkırdak transplantasyonunda hücreleri destekleyecek yapay ağ ve büyüme faktörü kullanılamamaktadır.

Yetişkin kaynaklı kök hücreler dünyada ve ülkemizde otolog veya heterolog olarak yıllardır kan hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta, son yıllarda da özellikle ölümcül ve yaşamı olumsuz yönde etkileyen, tıbben kesin ve etkili tedavi olanağı bulunmayan hastalıklarda tedavi amaçlı denenmektedir. Bununla birlikte kök hücrelerin doku mühendisliğinde kullanımında iki önemli özellik dikkate alınmaktadır: i) Hücrelerin yüksek sayıda ve kolay elde edilebilmesi, ii) Uygun in vitro ve in vivo şartlarda istenilen hücre ve doku yapısına kolayca ve yüksek oranda dönüşebilmeleri. Kemik iliği ve kordon kanından elde edilen hücreler her ne kadar ikinci özelliği verimli olarak sağlayabilse de elde edilme ve alındıktan sonra sayıca çoğaltma konusunda zorluklar yaşanmaktadır. Gamet Sağlık Hizmetleri A.Ş. ve İstanbul Memorial Hastanesi işbirliği ile İstanbul Memorial Hastanesi YÜT ve Genetik Merkezi bünyesinde 2003 yılında kök hücre çalışmaları başlatılmıştır. İlk aşamada elde edilen embriyonik kök hücreler kas, sinir, endotel gibi çok farklı hücrelere in vitro olarak farklılaştırılabilmiştir (Fındıklı ve ark., 2005). Benzer şekilde 2004 yılında başlatılan çalışmalarda insan yağ dokusundan elde edilen stromal hücrelerin kök hücre özellikleri taşıdığı ve uygun şartlarda sorunsuz olarak dondurulup saklanabildiği gösterilmiştir

(Akcin ve ark., 2005). Çalışmamızda yağ dokusundan elde edilerek kemik ve kırıkdağa farklılaştırılan hücreler doku mühendisliği uygulamalarında yukarıda değinilen özellikleri taşıdıklarından önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Adipoz doku kaynaklı kök (ADKK) hücreler lipoaspirasyon sonrasında veya abdominal subkutan yolla alınmış yağ dokusunun mekanik ve enzimatik yollar ile ayrıştırılması ile elde edilen ve in vitro şartlarda farklılaşmadan büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. ADKK hücrelerinin sahip oldukları yüksek in vitro kültür ve farklılaşma potansiyelleri ancak yeni anlaşılmağa başlanmıştır. Diğer yandan, ADKK hücrelerin tedavi ve araştırma amaçlı kullanım potansiyelleri bu hücrelerin diğer hücelere farklılaşma mekanizmalarının çözülmesi ile daha iyi anlaşılmalıdır. Bu nedenle ADKK hücrelerinin uygun biyomateryal destek ile kombine olarak büyütülmesi, kemik/kırıkdağ dokusuna farklılaşması ve uygun havyan modellerinde tedavi edici özelliklerinin belirlenmesi yakın gelecekte benzer uygulamaların insan çalışmalarında kullanılabilmesi için gerekli teknik gereksinimler ve mekanizmalarının hazırlanması açısından önem arz etmektedir.

İnsanda ilk kez 2001 yılında Zuk ve arkadaşları, 2001 tarafından ayrıştırılarak tanımlanan ADKK hücreleri, diğer yetişkin kök hücre kaynaklarıyla karşılaştırıldığında düşük verici morbiditesi ve yüksek oranda elde edilebilme özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamaları için uygun hücre kaynağı olarak görülmektedir. Günümüze kadar farklı gruplar tarafından gerçekleştirilen birçok çalışmada bu hücrelerin in vitro gelişimleri ve farklı hücre ve dokulara dönüşümleri incelenmiş, uygun şartlarda ADKK hücrelerin mezoderm kaynaklı kemik, kırıkdağ, kas, kalp kası, hücelerine dönüşebildiği gösterilmiştir. (Zuk ve ark., 2002; Planat-Benard ve ark., 2004; Rodriguez ve ark., 2005; Lendenckel ve ark., 2004). ADKK hücrelerinin kemik/kırıkdağ defektlerinin tamirinde kullanımı konusunda sınırlı in vivo çalışma bulunmaktadır. HA-TCP ile kombine edilerek SCID fare modeline nakledilen insan ADKK hücrelerinin osteoid oluşturdukları saptanmıştır (Hicok ve ark., 2004). Cowan ve arkadaşları yakın zaman önce fareler üzerinde gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada farelerin karın bölgesinden elde edilen ADKK hücrelerinin uygun biyomateryal (PLGA) ile birleştirildikten sonra ciddi kalvaryal defektlerin tamirinde efektif olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde Vetstem adlı şirketin adipoz kaynaklı kök hücreler ile atlar üzerinde Cornell Üniversitesi ile birlikte gerçekleştirdikleri çalışmalarında subkondral kemik ve kırıkdağ defektlerinde ve tendon yaralanmalarında nakledilen otolog ADKK hücreleri ile tedavi sağlandığı bildirilmektedir (www.vet-stem.com/Enhanced/). Ancak verilere göre, ADKK hücreleri in vitro koşullarda henüz tam anlamıyla kemik ve kırıkdağ progenitör hücelerine yoğun olarak dönüştürülemede, genetik olarak değiştirilerek belirli büyüme faktörleri salgılaması sağlanan hücelerde bu oran yükseltilebilmektedir (Peterson ve ark., 2005; Yang ve ark., 2005).

Projenin Başlangıcındaki Amaçlar:

1. Cam fazı eşliğinde sinterlemiş gözenekli HA/TCP seramikleri eser elementlerle birleştirerek kemiğin inorganik yapısına bir adım daha yaklaşan yapay ağılar elde etmek ve dolayısıyla doku uyumunu arttırmak,
2. Seramiklerin mekanik manipulasyonu ile içine uzunlamasına doku ve damar yapılarının ilerlemesine olanak sağlayacak mikro kolonlar açmak,
3. Oluşturulacak kolonların ve gözeneklerin bir bölümünü polimerle kaplayarak kemiğin organik komponenti olan kolajeni örneklemek,
4. Kullanılacak polimerin normal doku oluşumunu hızlandıracak ve kontrol edecek büyüme faktörleri ile birleştirilmesi,
5. Uygun laboratuvar şartlarında ADKK hücrelerinin elde edilerek tanımlanması ve farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi,
6. Polimer/seramik kompozit ile ADKK hücrelerini birleştirerek doku mühendisliği yaklaşımıyla yapay doku oluşturmak - bu dokuyu in vitro ortamlarda denemek,
7. Elde edilen mühendislik ürünü yapay dokunun biyoyumluluğunu sınamaktır.

Projenin Özgün Değeri

Proje doku mühendisliği teknolojisinin bilimsel olarak geliştirilerek kas-iskelet sistemi hastalıkları veya hasarlarında kullanılabilmesi amacıyla geliştirilmesine yöneliktir. Proje yeni gelişmekte olan doku mühendisliği biliminin

a) ileri malzemeler,

b) hücre teknolojisi ve

c) büyüme faktörleri yapı taşlarına disiplinlerarası yaklaşım getirmektedir. İleri malzemeler bağlamında kemik ve kırıldak dokusunun temel yapı taşları olan inorganik ve organik fazlarının örneklenmesi yapılmıştır. İnorganik fazı örneklemek için gözenekli ve gözenekleri birbiriyle bağlantılı olan ve cam fazı eşliğinde sinterlenen HA/TCP (60/40) seramikler üretilmiştir. Bu seramikler ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği bölümünde geliştirilmiş, malzeme özellikleri belirlenmiş ve deneysel çalışmalarla etkinlikleri gösterilmiştir. Gerçekleştirilen projede HA/TCP (60/40) seramiklerin iki önemli yenilikle ele alınması sağlanmıştır. Bunlardan birincisi üretilen seramiklerin dokuya entegrasyonunun arttıracak mekanik işlemlerin yapılmasıdır. Seramik malzemenin kırılma yapısı nedeniyle üzerlerinde mekanik işlem yapılması güçtür. Bu nedenle seramiklere zarar vermeden sıkı bir şekilde tutabilmek için özel tutma ve bağlama aparatları yapılmıştır. Bu aparatlar kullanılarak seramiklere mikro CNC'de çeşitli çaplarda ve farklı yerleşim geometrilerinde uzun kolonlar açılmıştır. Kolonların oluşturulmasında amaç normal kemik dokusunda olduğu gibi içinde damarsal yapının gelişmesine izin verecek havasız kanal sisteminin örneklenmesidir.

İkinci önemli yaklaşım sinterlenmiş HA/TCP (60/40) seramiklere kemik dokuda varlığı ve etkisi bilinen bazı eser elementlerin eklenmesidir. Bu yaklaşımla kemiğin inorganik yapısına bir adım daha yaklaşarak doku uyumu artmış yapay ağırlar elde etmektedir.

Projeye özgün değer katan diğer bir malzeme yaklaşımı polimer kullanılarak kemiğin organik fazı olan tip 1 kollajenin örneklenmesidir. Tek başına polimerin seramik kompozitin gözeneklerine ve kolonlarına eklenmesinin yapay ağırla özellikle torsiyonel dayanıklılığını arttırması beklenmektedir.

Projenin hücre bağlamında özgünlüğü bu çalışmada ADKK hücrelerinin kullanılmış olmasıdır. Uluslararası literatürde ADKK'nın doku mühendisliği yaklaşımına yönelik kullanımına ait sınırlı sayıda kaynağa ulaşılmıştır.

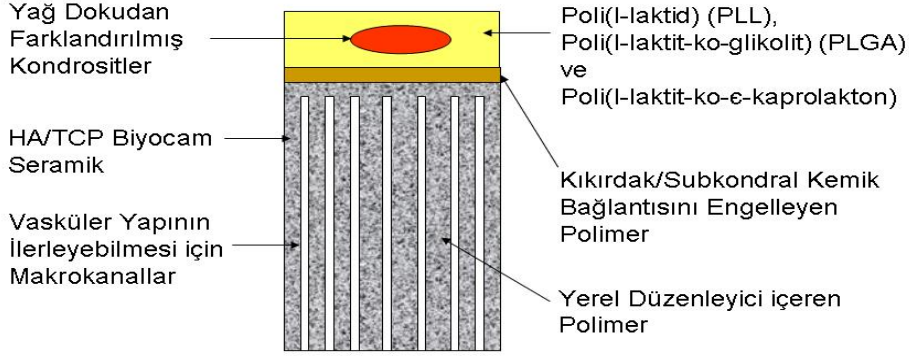
Projenin özgün son yaklaşımı da polimerin normal doku oluşumunu hızlandıran ve kontrol eden büyüme faktörleri ile birleştirilmesidir.

Proje bitiminde elde edilen bilgi birikiminin ve doku mühendisliği ürününün insanlığın kullanımına sunulması hedeflenmektedir. Çok merkezli (ODTÜ, Memorial, Hacettepe) ve çok disiplinli (Malzeme Mühendisliği, Tıp, Kimya, Biyoloji) bir yaklaşımla ele alınan projenin sonuçlarından birden fazla uluslararası yayının saygın derilerde çıkması beklenmektedir. Elde edilen doku mühendisliği ürününün yanı sıra üretim teknikleri, malzeme karakterizasyonu, eser elementlerin entegrasyonu, hücre çalışmaları ve büyüme faktörü çalışmalarına yönelik yeni yaklaşımların ulusal ve uluslararası ölçekte patentlenmesi düşünülmektedir. Alınacak patentlerden yurt içinde veya yurt dışında lisans veya PR olarak gelire dönüşme olasılığı yüksektir.

Kök hücre araştırmaları TÜBİTAK ve TÜBA gibi ulusal kurumlarımızın hazırlamış olduğu öngörü ve strateji raporlarında öncelikli araştırma alanlarında yer almaktadır. Rejeneratif tıpta geniş tedavi olanakları vaat eden ADKK hücrelerinin, biyomateryal bazlı tedavi protokollerinin ve hücre ekilmiş biyomateryal kullanılarak elde edilecek yapay dokuların ülkemizde de geliştirilmesi bu konudaki teknolojik birikimi sağlayarak ve adı geçen alanda uzmanlaşmış araştırmacılar yetiştirerek ülkemizin bilimsel arenada rekabet gücünü yükseltecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada hedeflenen doku mühendisliği ürünü kırıkdağın şematik çizimi Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Doku mühendisliği ürünü yapay kırıkdağ.

A) Hidroksiapatit (HAP) ve Trikalsiyum fosfat (TCP) Seramiklerin Hazırlanması

Kemik dokusunun inorganik bileşeni büyük oranda kalsiyum ve fosfat'tan oluşmaktadır. Kemiğin inorganik yapısını örneklemede TCP ve HAP kullanılmaktadır. Trikalsiyum fosfat bileşiğinin kimyasal bileşimi $Ca_3(PO_4)_2$ 'dir. Hidroksiapatit bileşiğinin kimyasal formülü ise $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 'dir. Kimyasal formüllerden de anlaşılacağı gibi sözü edilen fosfat bileşiklerinin bünyelerindeki Ca/P atom oranları farklıdır: TCP içindeki Ca/P oranı 1,5 ve HAP içindeki Ca/P oranı ise 1,67 dir.

Kemik dokusunun temelini HAP oluşturur. Dokunun fiziksel dayanıklılığı büyük oranda bu mineralden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle genel olarak yapay kemikler veya kemikle birleşmesi beklenen implantlar HAP içerir veya yüzeyi HAP ile kaplanır. HAP biyoyumlu olmasına karşın vücutta geç çözünür ve uzun süre varlığını implante edildiği kemik doku içerisinde sürdürür. Buna karşın TCP bileşiği HAP'a oranla daha hızlı çözünerek yerini iyileşen kemik dokusunda bırakır. Bu nedenle mekanik sağlamlık gerektiren kemik bölgelerinde HAP tercih edilirken kısa sürede çözünme arzulanan bölgede TCP bileşiğinden yararlanılır.

Bu projenin ilk aşamasında metabolik yönden aktif subkondral kemiğin örnekleme söz konusu olduğundan sinterlenmiş HAP+TCP seramiklerinden yararlanılmıştır. Son yıllarda HAP bileşeninin içine eser elementler katılarak başta biyoyum olmak üzere yeni işlevler kazandırılmaktadır. Eser element olarak stronsiyum (Sr) kullanımı öngörülmüştür. Günümüzde osteopozun tedavisinde ilaç olarak kullanılan Sr katkısının doku uyumunu artırması beklenmektedir. NIST standartlarına göre Sr katkı düzeyi projede 200 ppm dolayında tutulmuştur. Subkondral kemiğin mekanik yük alması nedeniyle dayanıklılığı arttırmak HAP+TCP kompozitinde HAP bileşiğine SiO_2 katılmıştır. Silisyum (Si) katkı düzeyi 500 ppm'dir. Seramik tozların hazırlanması ve seramik üretimine ait çalışmaların ayrıntıları aşağıda verilmektedir.

Seramik Toz Hazırlama Süreci

Literatürde kalsiyum fosfat bileşiklerinin üretimi için değişik yöntemler tanımlanmıştır. Termal sentezleme, hidrotermal sentezleme, kimyasal çöktürme, katı hal reaksiyonları, kristalizasyon, sol-jel, sabit kompozisyon oranları kullanılarak çöktürme gibi yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. İlk kez Hayek ve Newesely, 1963 tarafından 1963 yılında geliştirilen ve sonraki yıllarda da pek çok araştırmacı tarafından koşullara göre geliştirilerek kullanılan (Correia ve ark., 1996; Taş ve ark., 1997) homojen çöktürme yöntemi gereksinim duyulan seramik tozlarının üretilmesi için uygun yöntem olarak seçilmiştir.

Başlangıç malzemeleri olarak yüksek saflıktaki diamonyum fosfat ve kalsiyum nitrat tozlarından 0,5 M stok çözeltiler hazırlanmıştır. Si katkıları TEOS olarak Sr katkıları ise 0,1M derişimli Sr nitrat çözeltisi olarak uygulanmıştır. Si yer değiştirme düzeyi 500 ppm mertebesindedir. Üretilmek istenen kalsiyum apatitteki Ca/P oranı baz alınarak stok çözeltiler hazırlanmıştır. 750 ml'lik sıvı karışım geri soğutucu takılmış dört boyunlu balon içerisinde karıştırılarak 50 °C kadar ısıtılmıştır. Reaksiyon sisteminin sıcaklığı $\pm 0,5$ derece hassasiyetle kontrol edilmiştir. Bunun için sisteme kontakt termometre takılmış ve ısıtıcı ile çözeltinin sıcaklığı kontrol altında tutulmuştur. Balonun malzeme ilavesi için kullanılan ağızından fosfat çözeltisi 5 ml/dakika hızla ilave edilmiş ve fosfat ilavesi sırasında sistemin pH'ı üretilmek istenen kalsiyum fosfat bileşiğine göre 5 ila 11 arasında tutulmuştur. Fosfat ilavesinin bitiminden itibaren 24 saat süreyle karıştırılarak olgunlaştırılan çökeltiler 8000 rpm'lik santrifüj kullanılarak katı-sıvı ayrımı yapılmıştır.

Santrifüjleme süreci sonunda elde edilen katı çökelti de-iyonize su kullanılarak iki kez yıkanmıştır. 24 saat 80 °C'de kurutulan bu tozlar 800 °C'de kalsine edilmiştir. Bu süreç amorf nitelikteki kalsiyum fosfat tozunun kristallenmesi için gereklidir. Kalsine tozların faz analizleri X-ışını difraksiyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Çekimlerde monokromatik Cu-K α radyasyonu kullanılmış ve çekimler 0,05° (2 θ) aralıklarında 2 saniye beklenerek yapılmıştır. Ca/P oranı 1,5 olan çökeltinin Diferansiyel Termal Analiz (DTA) grafiği çıkarılmış ve uygun kalsinasyon sıcaklıkları bu grafik kullanılarak belirlenmiştir. DTA vakumlanmış ortama 100 ml/dak ile N₂ gazı altında oda sıcaklığından 1400 °C'ye 10 °C/dak ısıtma hızıyla ısıtmak suretiyle gerçekleştirildi.

Sinterleme Çalışmaları

Proje ekibi tarafından daha önce yapılan bir çalışmanın bulgularına dayanılarak (Cenk, 2007) bu projede üretilmesi planlanan yapay kemiklerdeki HAP+TCP oranının 60+40 olması planlanmıştır. Yukarıda açıklanan yöntemlerle üretilen kalsine edilmiş HAP ve TCP tozlarından molar bazda 60/40 oranında karışımlar tartılmış ve bunlar agat bir havanda etil alkol ortamında 1 saat süreyle karıştırılarak homojenize edilmiştir. Alkol tamamen buharlaştıktan sonra elde edilen karışımdan 10 mm çap ve 10 mm yüksekliğinde silindir numuneler preslenmiştir. Presleme işlemi paslanmaz çelik kalıpta 700 kg/cm² yük altında yapılmıştır. Peletler 1200 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle sinterlenmiştir. Sinterlenmiş peletlerin kırık yüzeyleri Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM)'de incelenerek pişirme sürecinin yapı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Gözenekli Yapay Kemik Üretimi

HAP+TCP karışımlarından gözenekli kemik üretmek üzere süngere emdirme yöntemi uygulanmıştır. Süreçte kullanılan sünger yanma sonrasında artık bırakmayan polimerden seçilmiştir. Uygun oranlarda tartılan HAP+TCP tozları kapaklı cam kavanoz içine alınarak etil alkol ve polivinil alkol (PVA) karışımı altında yarım saat süreyle homojenize edilmiş ve seramik asıltı (slip) haline getirilmiştir. Zımba yardımıyla kesilen silindir veya dikdörtgen prizma süngere seramik asıltı emdirilmiş, bunlar kurutulmuş ve daha sonra da sinterlenmiştir. Sinterleme sırasında sünger buharlaşma ve yanma sonucu uzaklaştığı için geride gözenekli seramik kalmıştır. Açıklanan yöntemle hazırlanan seramikler 1200 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle sinterlenmiştir.

Biyomekanik Testler

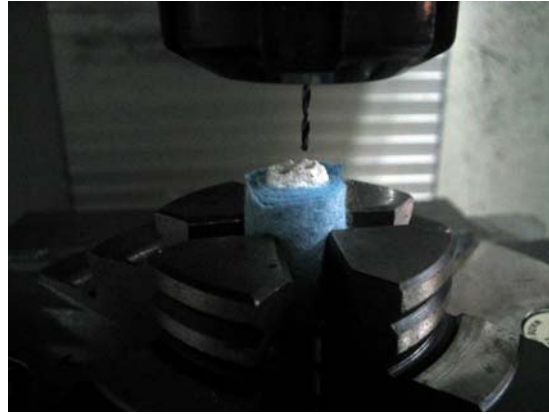
Elde edilen seramiklerin üç adedine soğuk basma mukavemetini belirlemek amacıyla basma deneyi uygulanmıştır. Deneylerde ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliğinde bulunan “Shimadzu AGS-J” mekanik test cihazı kullanılmıştır. Basma deneylerinde kullanılan test cihazı Şekil 13’te gösterilmiştir. Örnekler cihaza yerleştirildikten sonra 0,5 mm/s hızda mekanik yükleme gerçekleştirilmiştir. Soğuk basma mukavemeti kırılma anında uygulanan kuvvetin numunenin kesit alanına bölünerek ($\sigma = F/A$) formülü ile hesaplandı.



Şekil 13. Soğuk basma deneylerinde kullanılan test cihazı.

B) Seramik İmplantlara Mekanik İşlemlerin Gerçekleştirilmesi

Seramiklere mekanik olarak mikro CNC dik işleme merkezinde (Microcut-Challenger 2412-Taiwan; Fagor 8040 CNC Ünitesi) çeşitli çaplarda ve farklı yerleşim geometrilerinde uzun mikronize kanallar açılmıştır. Talaşlı imalatta kesmeyi kolaylaştırması, çıkan talaşları ortamdan uzaklaştırması ve de ısı kontrolü sağlaması amacıyla malzeme cinsine uygun olarak kesme sıvıları kullanılır. Ancak delinecek seramiğin gözenekli yapısı ve kimyasal özellikleri nedeni ile delme işlemi sırasında malzemeye zarar vermemesi ve kirliliğe yol açmaması için soğutma sıvısı yerine bu çalışmada kuru hava ile soğutma yapılmıştır. Malzemenin seramik olması kesme işlemi sırasında kesici takımın aşırı ısınmasına neden olacağı için yüksel ısıya dayanıklı karbür kesici takımlar kullanılmıştır. Isınmayı önlemek için sürekli bir delme işlemi yerine, 0,1 mm’lik adımlarla delme işlemi yapılmıştır. Çıkan seramik tozlarının rahat bir şekilde ortamdan atılabilmesini sağlamak için her adımda takımın malzeme yüzeyine geri kaçması sağlanmıştır. Kesme işlemi sırasında çeşitli dönme hızları denenerek, 5000 rpm dönme hızında optimasyon sağlanmıştır. Seramiklere makrokanallar açılırken izlenen süreçler Şekil 14’te verilen fotoğraflarda gösterilmiştir.



Şekil 14. Seramiklere makrokanallar açılırken izlenen süreçler.

C) Seramik/Polimer Kompozitlerin Geliştirilmesi

Subkondral kemiğin organik bileşeni örnekleme için seramiğin yüzeyi polimer film ile kaplanmıştır. Kaplama sırasında gözenek ve açılan mikronize kanalları kapatmayan bir yaklaşım sergilenmiştir. Polimer kaplamanın kemiğin tip 1 kollajen yapısını örneklemenin yanısıra bir görevi de seramiğin içine damar yapısının ilerlemesini sağlayacak vasküler endotelial büyüme faktörünün (VGEF) kontrollü salımını sağlamaktır. Bu amaçla biyolojik uyumlu ve bozunur polilaktid bazlı polimer ve kopolimerler poli(l-laktid) (PLL) ve poli(l-laktit-ko-glikolit) (PLGA) kullanılmıştır.

Kloroform içinde % 3'lük poli(l-laktid) (PLL) çözeltisine polimer komponentin 1/9'u kadar dekzametazon eklenmiştir. Bu çözelti gözenekli yapıdaki seramik içine kapiler emiş yolu ile doldurulmuştur. İşlemin ayrıntıları aşağıda verilmektedir.

-Seramik numune dik olarak polimer çözeltisine daldırılır ve üst yüzey havada kalacak şekilde bir süre beklenir.

- Numune tamamen çözeltiye batırılır ve sıvı yüzeyinin hareketsiz kalması beklenir.

- Numune dik olarak optimal bir hızda yukarı çekilir. Çekiş hızı film kalınlığını polimer çözelti viskozitesine bağlı olarak etkiler.

- Numune alt yüzeyinde oluşan asılı damla poroz kağıta emdirilerek alınır.

Hazırlanan seramik/polimer kompoziti havada asılı olarak tüm yüzeylerden 37 °C'de eşit olarak buharlaşması sonucu film kaplama işlemi sonuçlandırılır. Gözenekli yapıdaki seramiği ince polimer film ile kaplama işlemi % 5'lik poli(l-laktit-ko-glikolit) (PLGA) kullanılarak tekrarlanmıştır. Yapılan kaplamalarda kullanılan polimerler biyoyumlu ve biyobozunur polimerlerdir.

In vitro denemelerinde VGEF yerine deksametazon adı verilen ve büyüme faktörü salgılamasını modellediği bilinen glukokortikoid kullanılmıştır. Deksametazon etanolde tamamen suda ise kısmen çözülmemektedir. Poli(L-laktik asit) (PLLA) ve Poli(l-laktit-ko-glikolit) (PLGA) ile kapiler emiş yolu ile kaplanmış HA/TCP gözenekli seramiklere de soğuk basma testi uygulanmıştır.

Polikaprolakton Polimerinden Ağ Yapılı Sentetik Malzeme Üretimi

Kıkırdak yüzeyi oluşturacak ağ yapılı sentetik malzeme geliştirilmesi için polikaprolaktondan elde edilmiş ince polimerik elyaf malzeme eriyikten elyaf çekim yöntemi ile hazırlanmıştır. Elyafın teflon kalıp içerisinde preslenmesi ve alkol/aseton karışımı ile yapıştırılması sonucu oluşan yapının presleme basıncı ve elyaf çapı ayarlanarak kıkırdak kök hücre inokulasyonu için uygun ortam oluşturulmuştur.

D) Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (kYDKMKH) Çalışmaları

Projenin bu basamağında koyun yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (kYDKMKH) izolasyonunun gerçekleştirilmesi, yeterli miktarda üretilmesi, üretilen hücrelerin bir miktarının devam edecek olan karakterizasyon, farklılaştırma ve biyo uyumlu ve biyo bozunur polilaktid bazlı polimer ile biyolojik uyumunun incelenmesi amaçlandı. Çalışmanın ilk aşaması olan kYDKMKH izolasyonu daha önce ekibimizce de insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonunda denenilen protokol kullanılarak gerçekleştirildi (Akcin ve ark., 2005; Zuk ve ark., 2001; Zuk ve ark., 2002). 3,5 aylık koyunun kuyruk kısmından steril koşullarda alınan yaklaşık 2,0 gram yağ dokusu fizyolojik tampon içinde laboratuvarımıza getirildikten hemen sonra kalsiyum ve magnezyum içeren fosfat tamponlu saline (DPBS) solüsyonu ile birkaç kez yıkandı ve ortalama 1-1,5 mm³'lük küçük parçalara bölünerek mekanik yolla küçültüldü. Yağ dokuları daha sonra 1 saat 37 °C'deki çalkalamalı su banyosunda kolajenaz tip II (2mg/ml) ile enzimatik yolla ayrıştırıldı. Enzimatik ayrıştırma sonunda tüm örnek 100 µm mesh'lik filtrelerden geçirilerek parçalanmamış dokuların ve debrilerin hücre süspansiyonundan uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Filtrelenmiş hücre süspansiyonunda bulunan kollajenaz enzimi ve kontaminantları uzaklaştırmak için süspansiyon, 1500 rpm'de (~400 g) 10 dakika santrifuj edildi ve süpernatant atıldı. Kollajenazın ve kontaminantların tamamıyla uzaklaştırılması için hücre pelleti bir kez daha 5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile yıkandı ve 7 dk santrifuj edildi. Santrifuj sonrası iki kez yıkanmış olan kYDKMKH içeren hücre pelleti, süpernatant atıldıktan sonra yavaş parmak darbeleriyle homojenize edildi ve 75 cm² lik kültür kaplarına ekilerek DMEM, FBS (20%), penisilin/streptomisin (1%) ve 2 mM L-glutamin (1%) içeren kültür ortamında büyütüldü.

kYDKMKH Hücrelerinin Karakterizasyonu

Flow Cytometry (Akışkan Hücre Tekniği)

Hücreler % 0,05'lik tripsin/0,53 mmol/L EDTA solusyonu ile kültür kabından kaldırıldı ve 2 mmol/L EDTA ve % 0,5 BSA içeren PBS ile resuspanse edildi. Hücreler hücre yüzey belirteçlerini gösteren antikolar ile boyandı ve FACS calibur (BD science) flow sitometre ile en az 5.000-10.000 hücre sayılarak analizleri gerçekleştirildi.

Histolojik İnceleme

Kıkırdak farklılaşması için oluşturulan pellet ve yapay ağ histolojik inceleme için öncelikle % 4'lük paraformaldehitte tespit edildi ve parafine gömüldü. Proteoglikanların varlığı, % 0,1'lik Safranin O solusyonu ve alcian blue ile inkübe edilerek gösterildi.

İmmunfluoresan İşaretleme:

Kıkırdak farklılaştırılması için, 35 mm'lik petriye 10 µl damla halinde 1×10^5 KYDKMK hücresi pellet olarak ekildi (mikro-mass) ve 15-21 kondrojenik farklılaşma medyası ile kültüre edildi. Kültür sonrası mikro-pelet petri üzerinde PBS ile yıkanıp soğuk metanolde fikse edilerek Tip II kollajen için işaretlendi.

KYDKMK Hücrelerinin Adipojenik and Osteojenik Farklılaştırılması

Adipojenik indüksiyon için %10'luk FBS (Hyclone), 100 nmol/L Dexamethasone (Sigma), 10 mmol/L β - gliserolfosfat (Sigma), 50 µmol/L askorbik asit (Sigma) ve % 1'lik penisillin-streptomisin-glutamin (GIBCO) içeren düşük glukoz içerikli DMEM (GIBCO) ortamında ve 35 mm'lik petride % 90-% 95 konfluent olan hücreler kültür edildi. Ortam 3-4 günde bir değiştirildi. Osteojenik farklılaştırma, % 10'luk FBS, 0,1 µM dexamethasone (Sigma) ve 50 µg/ml askorbik asit (Sigma) eklenmiş DMEM ortamında 4 hafta kültür yapılarak sağlandı. Mineralizasyon için 3 mM NaH_2PO_4 osteojenik ortama eklendi.

Osteojenik farklılaşmayı değerlendirmek için kalsiyum ve kalsiyum iyon mineralizasyonu gümüş nitrat (Sigma) (von kossa) ile boyandı. Kültürler % 10'luk soğuk formalinde fikse edildi ve % 2,5'lik gümüş nitrat ile 60 W'lık UV lambası altında 30 dakika boyandı. Hücreler distile suda 4 defa yıkandı.

KYDKMK Hücrelerinin Kondrojenik Farklılaştırılması

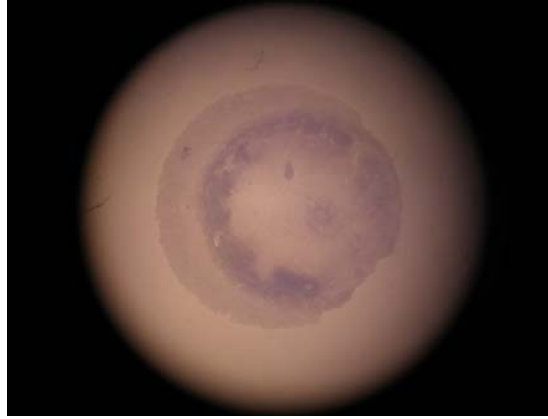
İn vitro farklılaştırma:

Kondrojenik farklılaştırma, mikropelletin (1×10^5 hücre) 10 ng/ml TGFbeta1 (transforming growth factor beta1) (R&D Systems) içeren kondrojenik ortamda 21 gün süresince kültür edilmesi ile indüklendi.

KYDKMK hücreleri, 1500 devirde 5 dakika santrifüj edilerek mikropellet oluşturuldu. Bu mikropelletler, 15 ml'lik konik tabanlı tüplerde (Şekil 15) (Falcon) ve histokimyasal ve immunfloresan boyamalar için 35 mm'lik tek-gözlü petrilerde (Şekil 16) kültüre edildi. Kondrojenik indüksiyon, % 1 ITS (insülin-transferin-selenyum) (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), 100 nm dexamethasone, 50 mm askorbik asit 2-fosfat 35 mg/ml prolin (Sigma) and 5 ng/ml TGFbeta1 (Sigma) içeren yüksek glikozlu DMEM'de 21 gün kültür edildi.



Şekil 15. KYDKMK hücreleri, mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 15 ml'lik konik tabanlı tüp içerisinde kondrojenik farklılaşma sonrası izlenmektedir.



Şekil 16. KYDKMK hücreleri, mikropellet (micro-mass) yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşma sonrası izlenmektedir. Stereomikroskop, X1,2.

E) Doku Uyumluluğu Çalışmaları

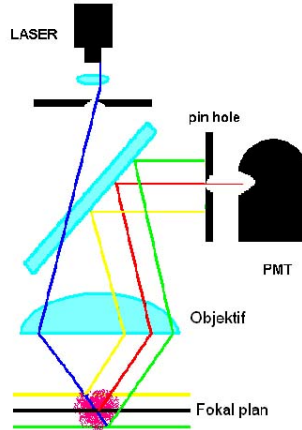
Polimer ilaveli HA+TCP kompozit seramiklerin biyoyuyluluk deneyleri için örneklerden bazıları sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işlemi Gamma-Pak Sterilizasyon Sanayii ve Ticaret A.Ş.Çerkezköy-Tekirdağ tesislerinde örneklerin Cobalt-60 gamma ışığında yaklaşık 13 saat tutulması suretiyle gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon sırasında örneklere uygulanan en az doz 25,7 kGy en yüksek doz ise 37,5 kGy olmuştur.

Işık Mikroskobu Çalışmaları

Agara gömülen hücre pelletleri fosfat tamponu içinde hazırlanmış, oda ısısındaki % 10'luk nötral formalin çözeltisine (pH 7,0) alındı. Örnekler sabit vakumlu doku takip cihazı (Leica TP 1020, Almanya) ve parafin istasyonunda (Leica, EG1150 H, Almanya) sırasıyla dereceli alkollerden geçirilerek rutin yöntemle parafine gömüldü. Parafin bloklardan kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler genel hücre morfolojisini değerlendirmek için hematoksilin eozin, hücre ve ekstraselüler matriksin farklanmasını değerlendirebilmek için Masson trikrom ve safranin O yöntemleriyle boyandıktan sonra Leica DMR model ışık mikroskobunda değerlendirildi. Görüntüler Leica DC500 dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarılarak kaydedildi.

Konfokal Mikroskobu Çalışmaları

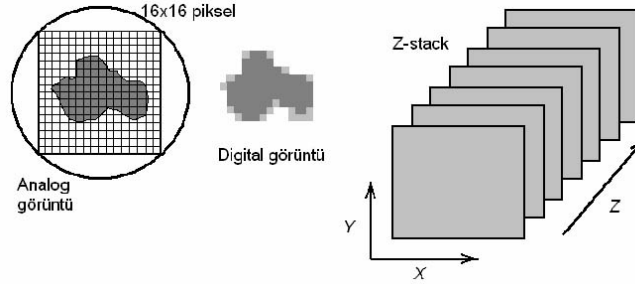
Biyomalzeme araştırmalarındaki en önemli hedeflerinden biri sentezlenmiş iskelet yapılar üzerinde canlı hücrelerin üretilip idame edilmesidir. Bu çalışmalar sayesinde biyo-mühendislik ürünü doku ve organ yedeklerinin geliştirilmesi yolu açılacaktır. Alandaki çalışmaların ana kurgusu, sentetik iskelet ile hücre uyumunun sağlanmasıdır. Günümüzde deri, kemik, kıkırdak, retina, kornea doku yedekleri geliştirilmesi alanında önemli ilerlemeler elde edilmiş bazıları gündelik tedaviye girmiş bulunmaktadır. Bu alandaki çalışmalarda hücrelerin ekildikleri sentetik iskelet üzerinde canlı kaldıklarının, proliferasyonlarının iskelet ile uyum sağladıklarının takip edilmesi, ekilen hücrenin istenen fonksiyonu yerine getirdiğinin tespiti hayati öneme sahiptir. Bilinen mikroskop yöntemlerinin bu alandaki çalışmalarda kullanılması pek uygun değildir. Çünkü sentetik doku matriksi derinlik ve katmanlar içerecek şekilde tasarlanmak zorundadır. Hücrelerin yerleşip proliferasyon olabileceği ortam katlar, delikler, kanallar içermek zorundadır. Bu nedenle bildik yöntemlerle yapılabilecek gözlemlerle organ yedeğinin sadece yüzeyi görüntülenebilir ve üçüncü boyutla ilgili herhangi bir tespit yapmak mümkün olmaz. Matriksi fiske edip dilimlemek önerilse de ortamdaki hücrelerin canlılığı kalmayacağından tercih edilmez. Bu tür araştırmalar için dikey ekseninde kesin çözünürlüğü olan bir mikroskop yöntemi gereklidir. Günümüzde kullanılan mikroskop teknikleri arasında sadece iki yöntemle dikey ekseninde kesin ve güvenilir çözünürlük elde etmek mümkün olabilir; Konfokal Mikroskop ve Multifoton Mikroskop. Şekil 17’de konfokal mikroskobu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 17. Konfokal mikroskop.

Her iki yöntem de floresan esaslı lazer taramalı ışık mikroskobu prensibine dayanmaktadır. Ancak aralarında bazı işleme prensibi farkları ve bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Konfokal prensip, noktasal bir ışık kaynağına ait görüntünün, bir delikli levha ile süzülerek sadece odak düzlemindeki kısmının görüntülenmesi esasına dayanmaktadır. Yandaki resimde gösterildiği üzere kullanılan nokta ışık kaynağı bir lazerdir. Sature ışık kaynakları bu amaçla kullanılamaz. Kondensörden geçen ışık dikroik aynadan geçer objektif üzerinden örneğe yönelir. Lazer ışığı floresan işaretli örneği geçerken yol boyunca tüm floresan molekülleri uyarır. Uyarılan tüm moleküllerden her yönde yayılan floresan emisyon çıkar. Odak planındaki fluoroforlardan kaynaklanan emisyon geometrik optiğinin kurallarına uygun olarak objektif tarafından toplanır. Emisyon dalga boyu daha uzun olduğundan dikroik aynadan yansımacaktır. Yansıyan ışığın karşısına ortasında küçük bir delik (pin hole) olan bir plaka konur. Odaktan kaynaklanan emisyon yayılım geometrisi nedeniyle tam deliğe denk geldiğinden “foton çarpıcı tüpe (photomultipliertube, PMT)” ulaşır enerjisini verir ve emisyon bu şekilde kayıt edilmiş olur. Buna karşın odak planının altından ve üstünden kaynaklanan emisyon yayılımları ise deliğe değil plağa çarptığı için kayıt olmazlar. Görüldüğü üzere nokta ışık kaynağı (lazer) ve pin hole kullanarak, fizik bir

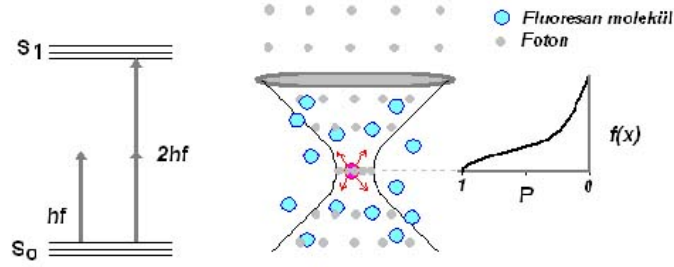
manipulasyonla çok katmanlı bir floresan cisimden, sadece odak planından kaynaklanan emisyon süzülüp kayıt edilmiş olur. Bu prensibin mikroskopiye uygulanması ile konfokal mikroskop geliştirilmiştir. Pin hole ile fokal plandan gelen ışığı süzdüğümüzü ve aynalarla tüm alanı taradığımızı düşünürsek, Şekil 18'de gösterildiği gibi her pikselden gelen emisyonu PMT ile voltaja çevirip sayısal bir veri halinde saklamak mümkündür.



Şekil 18. Konfokal mikroskopta görüntülemenin ilkeleri.

Bu durumda mikroskopik görüntü sayısal görüntü haline getirilmiş olur. Bu görüntü sadece odak planından süzülen emisyonu ait görüntü olduğundan noninvazif optik kesit alınmış olur. Daha sonra objektif Δz kadar kaydırılıp optik plan tekrar taranır, bu işlem ardışık olarak tekrarlanarak z ekseninde hepsi belli aralıklarla yerleşik "görüntü takımı (Z-stack)" elde edilmiş olur. xy planında pikselleme yapıldığından ve z ekseninde iki fokal plan resmi arasındaki mesafe mekanik olarak belirlendiğinden her üç eksen bilgisi hatasız olarak kayıt edilmiş olur. Bu bilgiler digital ortamda bir araya getirilerek örneğin üç boyutlu görüntüsü oluşturulur. Bu yöntem uygulanarak biyo-malzemenin derinliklerinde yerleşik hücre veya diğer biyolojik moleküllerin gerçek görüntüleri elde edilebilir. Biz biyofizik anabilim dalında konuştukları cihazla bu tür araştırmaları 2000 yılından beri başarı ile uyguluyoruz. Başka hiçbir yöntemle bu bilgilerin elde edilmesi mümkün değildir. Bu yöntem kullanılarak dokunun 50-100 mikrometre derinliklerine ortama hasar vermeden (noninvassive) bakmak mümkündür. Daha derinlere inebilmek için uyarı ışığının enerjisinin artırılması gerekir ancak, bu durumda hücrelere yüksek enerji uygulanmış olur ki bu da canlı hücrelere uygulanamadığından en büyük dezavantaj olarak karşımıza çıkar.

Daha derinlere inebilmek için multifoton mikroskop geliştirilmiştir. Burada amaç, floresan molekülü maksimum uyaran dalga boyunun yarısı enerjiye sahip iki katı uzunlukta dalga boyuna sahip bir ışık kullanarak uyarılmasıdır. Uyarı ışığındaki her bir foton uyarılama için gerekli enerjinin sadece yarısını içerdiğinden, uyarılma için floresan moleküle iki fotonun eş zamanlı çarpması ve enerjilerinin toplanarak molekülü uarmaları gerekir. İki fotonun eş zamanlı olarak aynı noktada bulunma olasılığı en yüksek merkezi aydınlanma noktasında gerçekleşecektir. Dolayısıyla sadece odak noktasındaki floresan moleküller spesifik olarak uyarılacağı için odak planı taranarak optik kesitler almak mümkün olacaktır. Multi-foton sisteminde düşük enerjili uyarı ışığı kullanıldığından dokunun daha derinliklerine inmek mümkün olur. Bu yöntemle dokunun 0,5-1 mm derinliklerine inmek mümkün olur. Bu mesafe, hücre boyutunun 10-20 μm civarında olduğu düşünüldüğünde çok önemlidir. Örneğin canlı bir hayvanda beyin, böbrek gibi dokulara mikroskop yansıtılarak yüzeyden 0,5-1 mm derinlerdeki hücrelerin mikroskopik çözünürlükte görüntülerinin oluşturulması mümkün olur. Multi-foton mikroskopi sistemi biyomühendislikte çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Sadece organ yedeklerinin canlılık tespiti için değil, hasta hayvanlara verilen kök hücrelerin istenen organda birikip birikmediğinin in situ tespiti için de kullanılabilir. Ülkemizde henüz böyle bir cihaz mevcut değildir. Eğer imkan sağlanırsa nano-teknoloji ve biyo-mühendislik alanında çalışan araştırmacıların hedef hücre ve moleküllerini doku veya matriks içinde in situ görüntüleme imkanını oluşturulabilir. Konfokal mikroskopta 3 boyutlu tarama şematik olarak Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19. Konfokal mikroskopta 3 boyutlu tarama.

Mevcut çalışmada konfokal mikroskopi tekniği sentetik doku matrislerine implant edilmiş hücrelerin yerleşip çoğalmasını takip amacıyla kullanıldı. Biyomalzeme üzerindeki canlı hücreler serumsuz alfa MEM kültür ortamında 2 saat süreyle 37 °C'de lipofilik dialkilokarbosiyanin fluoressan bir boya olan DiL (Invitrogen 10 µg /ml serumsuz alfa MEM kültür ortamında) ile işaretlendi. 0,01 M fosfa tamponlu salin (PBS) ile yıkandıktan sonra 60 dakika süreyle PBS içinde % 2,5'lik gluteraldehit ile tespit edildi. Örneklerin fluoressan işaretlenmesi kontrol edildikten sonra birkaç defa PBS ile yıkanarak konfokal mikroskop (LSM Pascal, Zeiss Germany) ile 543 nm lazer çizgisi kullanılarak uyarıldı, oluşan emisyon 560 nm bariyer filtreden geçirilerek kayıt edildi. Z-takım görüntülerinden 0° için XY projeksiyon görüntüleri oluşturuldu (Puralı, 2008).

Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskobu Çalışmaları

Taramalı elektron mikroskobunda incelenecek hücre biyomalzeme kompozitleri 90 dakika süreyle oda ısısında % 2,5'luk gluteraldehit ile tespit edildi. Petriden çıkarılan örnekler oda ısısında kurutulduktan sonra yüzeyleri altınla kaplandı. Kaplanan örnekler NORAN System 6 X-ray Microanalysis System & Semafore Digitizer - EDS destekli elektron mikroskobunda (JSM-6400, JEOL, Japonya) görüntülendi.

Geçirgen (Transmisyon) Elektron Mikroskobu Çalışmaları

Agar içine alınan hücre pelletleri PBS içindeki % 2,5'luk gluteraldehit ile iki saat oda sıcaklığında tespit edildikten sonra tampon solüsyonunda yıkandı. Daha sonra doku parçaları fosfat tamponlu %1'lik ozmiyum tetroksit içinde 4 °C'de bir saat süreyle tekrar tespit edildi. Sabit ajitasyon sağlayan doku takip cihazında (Leica, Almanya) dereceli etil alkollerden geçirilerek dehidrate edilen hücre örnekleri araldite (Cy 212, Agar) gömüldü. Yarı ince kesitler, metilen mavisi-Azur II ile boyandıktan sonra Leica DMR model ışık mikroskobu ve bağlantılı dijital kamera ile incelenip kaydedildi. İnce kesitler uranil asetat - kurşun sitratla boyandıktan sonra Jeol JEM1400 marka elektron mikroskobunda Orius marka dijital kamera ile incelenerek kaydedildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada elde edilen yapay kıkırdak ağın makroskopik görüntüsü Şekil 20'de sunulmuştur.



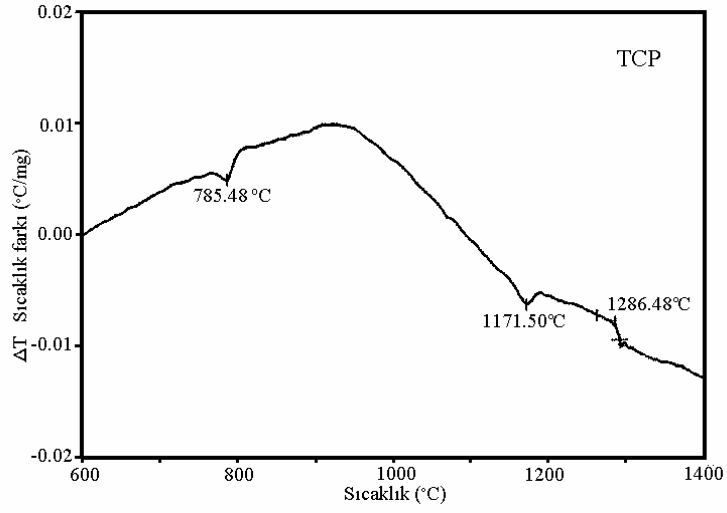
Şekil 20. Elde edilen yapay kıkırdak ağın makroskopik görünüşü.

A) Hidroksiapatit (HAP) ve Trikalsiyum fosfat (TCP) Seramiklerin Üretimi

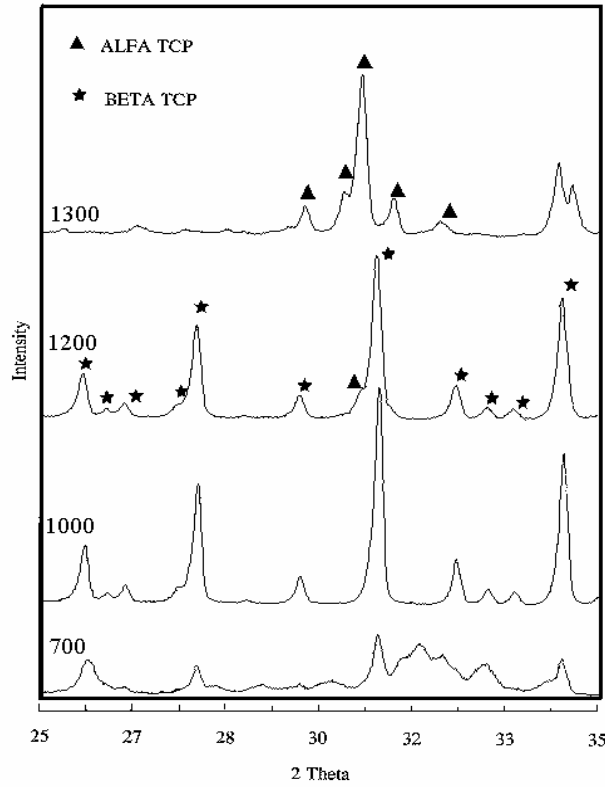
TCP ve HAP Tozlarının Karakterizasyonu

TCP öncülü tozların sıcaklık karşısındaki davranışını belirlemek amacıyla çekilen DTA eğrisi Şekil 21'de verilmiştir. Bu eğri incelendiğinde sistemde iki adet reaksiyon olduğu gözlenmektedir. 785 °C'deki birinci reaksiyon TCP öncülü tozun TCP'ye dönüşüm reaksiyonudur. Tri-kalsiyum fosfatın dört ayrı kristal yapısı vardır (Taş ve ark., 1997). Düşük sıcaklıkta kararlı olan beta-TCP kristal yapısı üretim yöntemine bağlı olarak 1120 ila 1250 °C arasında alfa-TCP'ye dönüşür. DTA eğrisinden aldığımız bilgiye göre bu projede üretilen TCP öncül tozunun beta-TCP↔alfa-TCP dönüşüm sıcaklığı 1170 °C civarındadır. Amorf tozlar DTA eğrisi referans alınarak seçilen değişik sıcaklıklarda kalsine edilmiş ve daha sonra bunların faz analizleri yapılmıştır.

Şekil 22'de farklı sıcaklıklarda kalsine edilen TCP tozlarının XRD kırınım diyagramları görülmektedir. 1000 °C'de kalsine edilen tozlar saf beta-TCP dir. 1200 °C'de kalsine edilen tozlar da genel olarak beta-TCP yapısındadır. Tozda az miktarda alfa-TCP oluşumunun yer aldığı görülmektedir. 1300 °C'de kalsine edilen numunede, vücut sıvısında çözünürlüğü daha fazla olan alfa-TCP fazı saptanmıştır. DTA ve XRD analizi sonuçlarına göre beta-TCP fazını içermesi istenen kalsiyum fosfat seramiklerinin üretiminde kullanılacak tozlar için 1000 °C uygun bir kalsinasyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

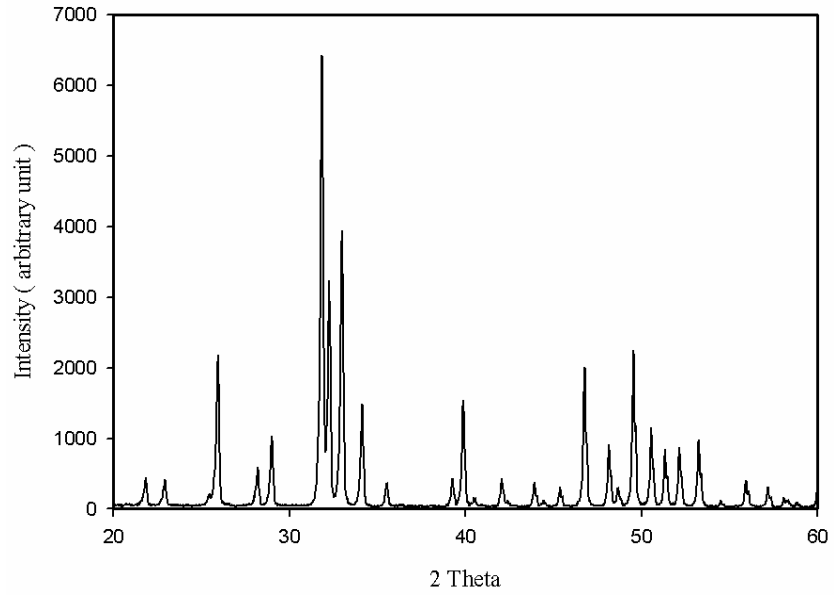
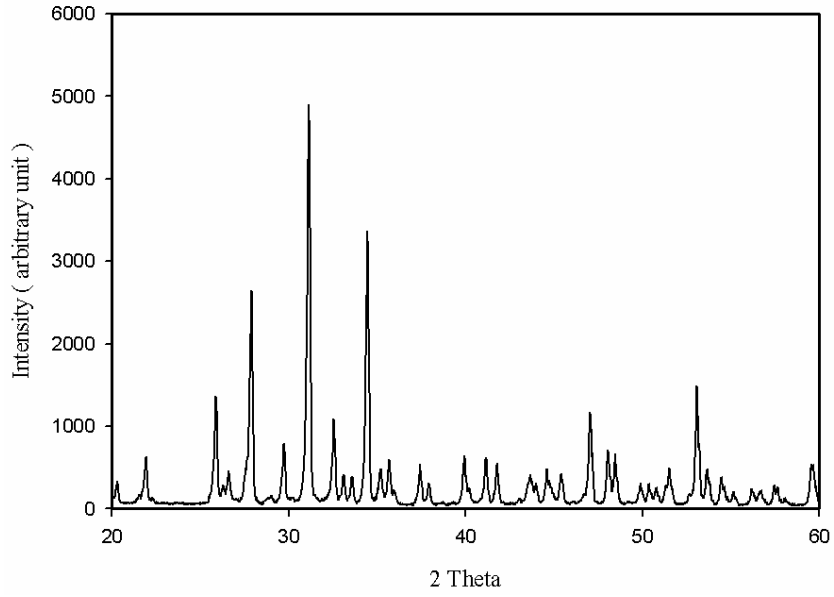


Şekil 21. TCP tipi kalsiyum fosfat bileşimini veren öncül tozun DTA eğrisi.



Şekil 22. Kalsinasyon sıcaklığına bağlı olarak TCP öncül tozlarında kristal faz oluşumu.

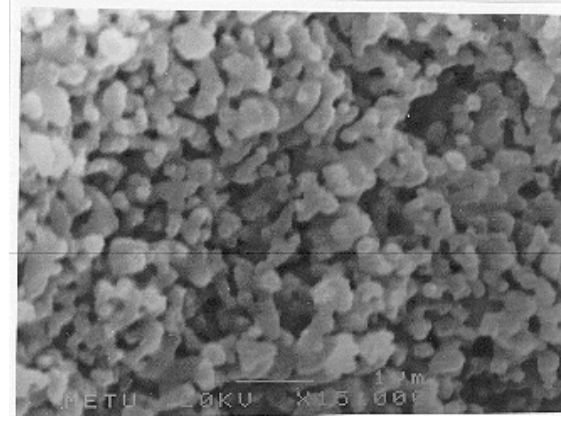
HAP tozlarının kalsinasyonu için de TCP için tanımlanan yöntem uygulanmıştır. 1000 °C sıcaklıkta kalsine edilen amorf haldeki öncül HAP tozunun tamamen kristalize olduğu belirlenmiştir. Yukarıda açıklanan yöntemlerle üretilen TCP ve HAP tozlarına ait XRD diyagramları Şekil 23'de verilmiştir. 200 ppm Sr ve 500 ppm mertebesindeki Si katkıları ile üretilen HAP tozunun XRD diyagramı ile saf HAP bileşiminin XRD diyagramı arasında fark bulunmamaktadır.



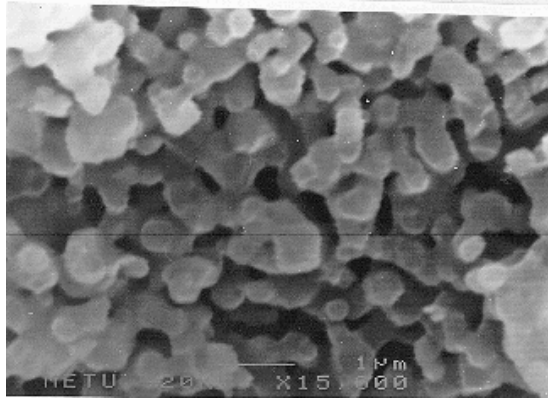
Şekil 23. TCP ve HAP tozlarına ait XRD kırınım diyagramları.

Sinterleme Çalışmaları

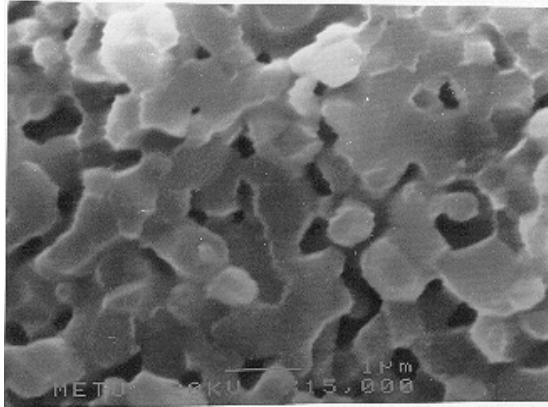
HAP+TCP karışımlarından meydana gelen kompozit seramiklerde sinterleme işlemi sonucunda elde edilen örnek mikro yapılar Şekil 24'de gösterilmiştir. SEM resimlerinden de anlaşılacağı gibi gözenekçi düşük ve mukavemeti yüksek olan bir yapının elde edilebilmesi için 1200 °C sıcaklık optimum bir işlem sıcaklığıdır. Bu sıcaklıkta alınan SEM fotoğrafının büyütme oranı farklı olmakla birlikte sinterlenmiş yapının diğerlerine oranla güçlendiği görülmektedir.



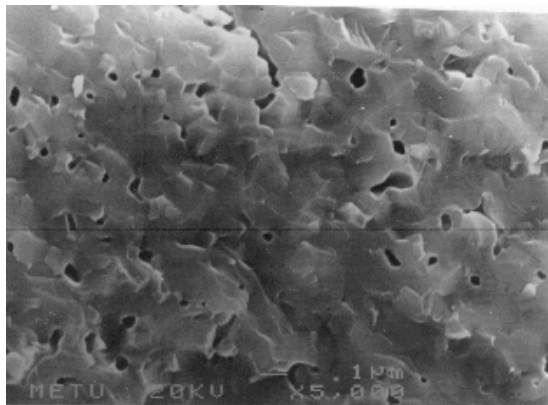
900 °C



1000 °C



1100 °C



1200 °C

Şekil 24. Değişik sıcaklıklarda sinterlenen HAP/TCP karışımlarının SEM fotoğrafları.

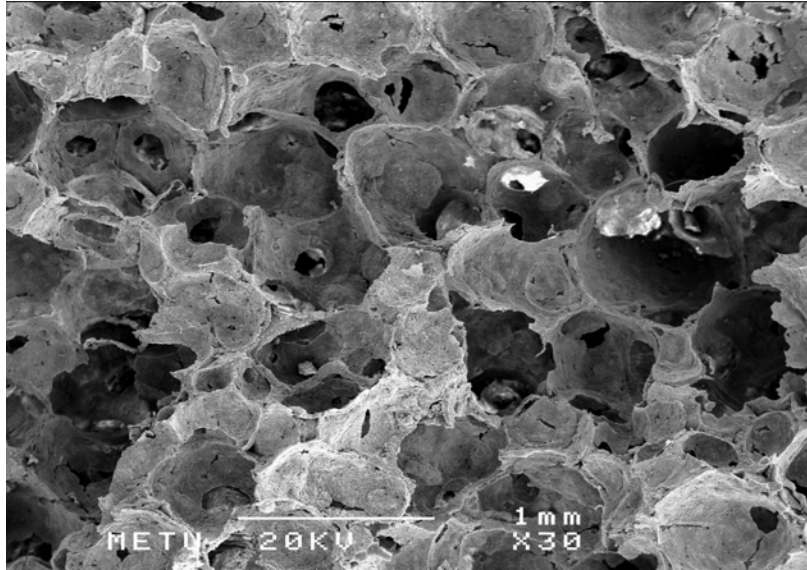
Gözenekli Yapay Kemik Üretimi

Asıltı emdirilerek kurutulmuş ve sonra da 2 saat süreyle 1200 °C sıcaklıkta sinterlenerek üretilen gözenekli seramikler Şekil 25'te görülmektedir. Cam fazı eşliğinde sinterlenmiş olan bu seramikler makroskopik ve mikroskopik yapıları itibarıyla subkondral kemiği örneklemektedir.



Şekil 25. Gözenekli kompozit seramik örnekleri.

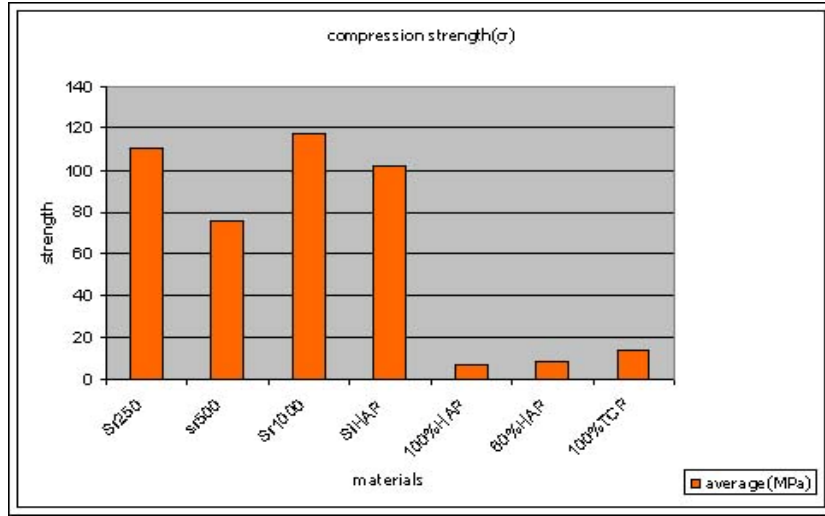
Şekil 26 gözenekli seramiğin kırık yüzeyinin SEM altındaki görüntüsüdür. Gözenek boyutları ortalama 700 µm dolayındadır. Gözenekler arası kanalların çapları 100 µm ile 400 µm arasında değişmektedir. Bu yapı kemiğe uygulandığında hücrelerin kemik içerisine ilerlemesi için idealdir.



Şekil 26. Seramiklerin gözenek yapısını gösteren SEM fotoğrafı.

Biyomekanik Test Sonuçları

Mikroyapıları Şekil 26'da görülen HAP+TCP kompozit seramiklerin 1200 °C sıcaklıkta 4 saat süreyle sinterlenmiş olan örnekleri üzerinde gerçekleştirilen soğuk basma deneyleri sonucunda elde edilen basma dayanım değeri 104 MPa mertebesindedir. Si ve Sr katkıli kompozit seramiklerde bu değer 110 MPa kadar yükselmiştir. Sünger yöntemi ile üretilen gözenekli HAP+TCP seramiklerin basma mukavemeti ise 3,24 MPa olarak belirlenmiştir. Biyomekanik test sonuçları grafik olarak Şekil 27'de gösterilmiştir. Si ve Sr katkıları ihtiva eden ve cam fazı eşliğinde sinterlenmiş olan bu seramiklerde gözenek oranı %70 dir. Gözenek oranındaki farklılıklar dikkate alındığında elde edilen sonuç literatürdeki verilerle oldukça uyumludur (Cenk, 2007).



Şekil 27. Biyomekanik test sonuçları.

B) Seramik İmplantlara Mekanik İşlemlerin Gerçekleştirilmesi

Seramiklerin yapısını bozmaksızın makrokanalların açılması bu araştırmada başarılıdır. Seramiklerin makrokanallar açıldıktan sonraki görünümü Şekil 28'de verilmektedir.



Şekil 28. Seramiklerin makrokanallar açıldıktan sonraki görünümü.

C) Seramik/Polimer Kompozitlerin Geliştirilmesi

Seramiklerin polimerle kaplanması aşamasında birinci kaplama sonucu ağırlıkça % 3, ikinci kaplama sonucu yine artı % 3 civarı ağırlık artışı gözlenmiştir.

Test sonuçları (3 numunenin ortalaması), biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerin gözenekli seramiğin soğuk basmaya dayanıklılığını arttırdığını ortaya çıkarmıştır. Tablo 3'de basma deneyleri sonucu elde edilen soğuk basma dayanma değerleri verilmiştir. Polimer kaplamalar seramiklerin soğuk basma dayanıklılığını göreceli olarak 3 katı arttırdığı saptanmıştır.

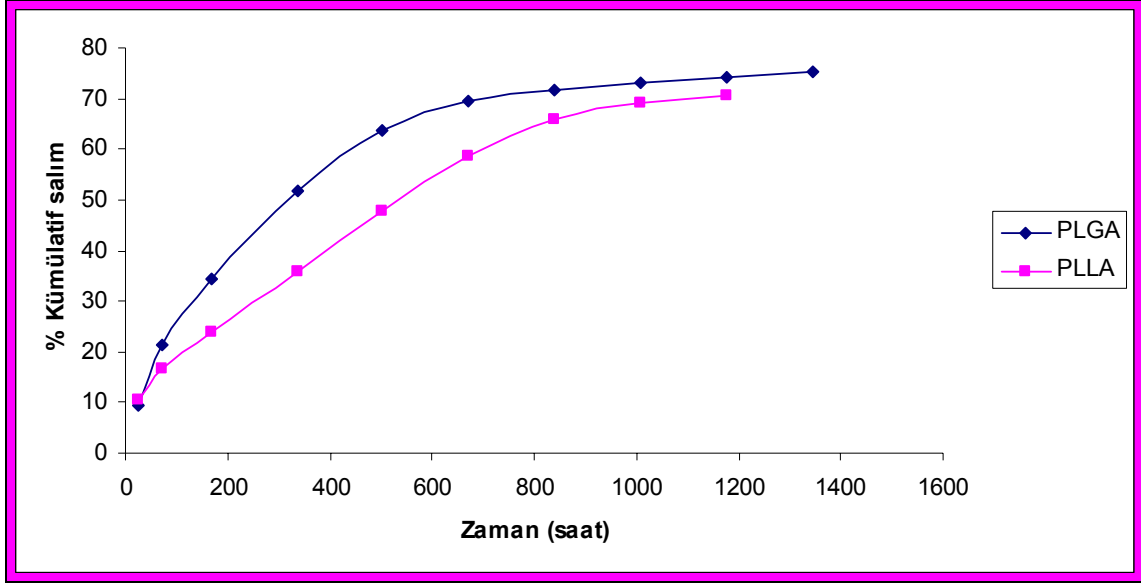
Tablo 3. Soğuk basma test sonuçları.

Numune	Ortalama Soğuk Basma Kuvveti (Newton)	Ortalama Soğuk Basma Mukavemeti (MPa)
Polimer kaplamasız seramik	163	3,24 ± 0,25
PLGA kaplı seramik	524	10,42 ± 0,25
PLLA kaplı seramik	480	9,54 ± 0,25

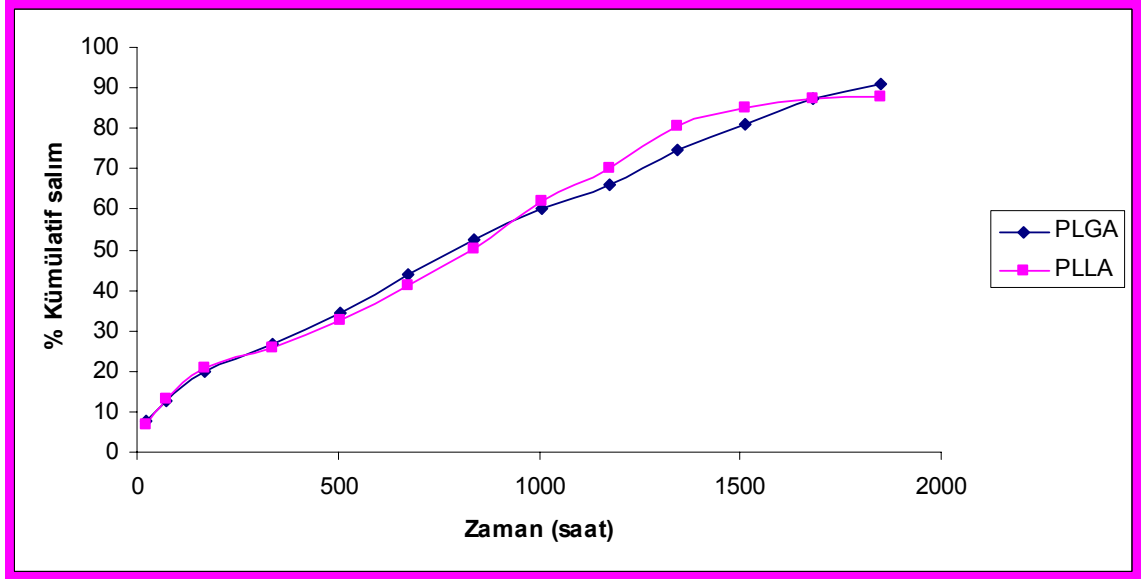
D) PLLA ve PLGA Kaplı Gözenekli Seramiklerin İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmalarında, ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği bölümünde üretilen, deksametazon içeren poli(L-laktik asit) (PLLA) veya poli(l-laktit-ko-glikolit) (PLGA) çözeltisi ile kapılar emiş yolu ile kaplanan küp ve silindir şeklindeki gözenekli seramikler kullanılmıştır (deksametazon/polimer=0,1). Gözenekli seramik numunelerden salınan deksametazon miktarı UV-VIS spektrometresi kullanılarak saptanmıştır. İn vitro salım çalışmalarında büyüme hormonu yerine, yapısal ve işlevsel benzerliği nedeni ile deksametazon kullanılmıştır.

Silindir şeklindeki PLGA kaplı seramik numune toplamda % 75'lik deksametazonu 8 hafta boyunca, silindir şeklindeki PLLA kaplı seramik numune toplamda % 70'lik deksametazonu 7 hafta boyunca, küp şeklindeki PLGA kaplı seramik numune toplamda % 91'lik deksametazonu 12 hafta boyunca, küp şeklindeki PLLA kaplı seramik numune ise toplamda % 87'lik deksametazonu 11 hafta boyunca salmıştır. Polimer kaplı numunelerin salım grafikleri Şekil 29 ve Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 29. Silindir şeklindeki gözenekli seramiklerden salınan dekzametazon yüzdesi.



Şekil 30. Küp şeklindeki gözenekli seramiklerden salınan deksametazon yüzdesi.

E) Polikaprolakton Polimerinden Elde Edilmiş Ağ Yapılı Sentetik Malzemelerin Mekanik Özellikleri

Kıkırdak doku onarımında kullanılan ve yağ dokusundan elde edilen stromal hücrelerin kıkırdak dokusuna farklılaşabilmeleri için üç boyutlu ve gözenekli iskelelere ihtiyaçları vardır. Üç boyutlu ve gözenekli iskeleleri oluşturmak için çeşitli sentetik polimerler kullanılmaktadır. Kıkırdak hücreleri dışında bulunan ağ yapısı özellikle eklem kıkırdak dokusunun mekanik özellikleri için önemlidir. Kıkırdak doku onarımlarında kullanılacak iskelelerin orijinal eklem kıkırdağı ağını taklit etmesi gereklidir.

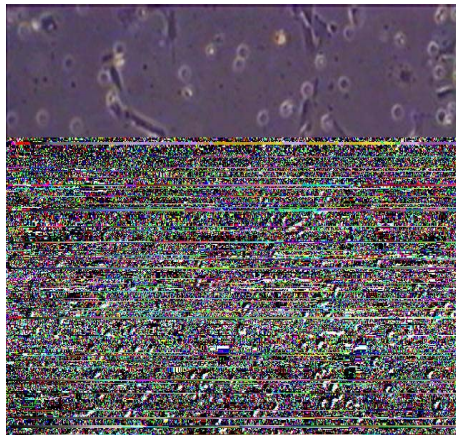
Kıkırdak oluşumunu sağlayacak ağ yapılı sentetik malzeme geliştirilmesi için polikaprolaktondan elde edilmiş ince polimerik elyaf malzeme hazırlanmıştır. Elyafın teflon kalıp içerisinde preslenmesi ve alkol/aseton karışımı ile yapıştırılması sonucu oluşan yapının presleme basıncı ve elyaf çapı ayarlanarak kıkırdak kök hücre inokulasyonu için uygun ortam oluşturulması amaçlanmaktadır. Hazırlanan malzemelerin mekanik özelliklerinin incelenmesi için, malzemelere "Shimadzu AGS-J" cihazında soğuk basma testi uygulanmıştır. Test sonucu, ağ yapılı malzemelerin 2,24 MPa yük altında eğildikleri gözlemlenmiştir. Malzemelerin yük altındaki deformasyonu ortalama olarak %16 dır.

Polikaprolakton Polimerinden Ağ Yapılı Sentetik Malzeme Üretimi

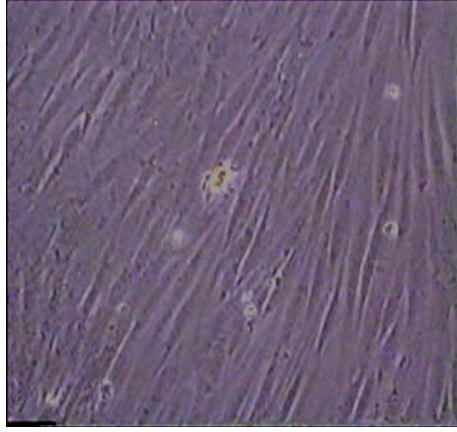
Hazırlanan polikaprolakton polimerik ağ % 75 oranında ve 100-300 µm boyutlarında gözenekli yapıya sahip olduğu bulunmuştur. Kullanılan polikaprolakton polimerinin erime sıcaklığı; DSC cihazında birinci ısıtmada (1. run) 62 °C, ikinci ısıtmada ise (2. run) 55 °C olarak tespit edilmiştir. Oluşturulan malzeme radyasyon sterilizasyonu yapıldıktan sonra hücre ekim çalışmaları için hazırlanmıştır.

F) Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (kYDKMKH) Çalışmaları

% 20 oranında FBS (fetal bovine serum; Perbio Science France SAS, Brebieres, France), % 1 oranında penisilin/streptomisin ve 2 mM L-glutamin (%1) içeren DMEM kültür ortamında büyütüldü. Şekil 31'de kYDKMKH öncül koloniler, pasaj:0. Kültür kabına tutunan ve tutunmayan hücreler görülmektedir. Büyütülen hücreler 5-7 günde bir pasaj 3'e kadar pasajlanarak yeterli sayıda ve homojenlikte hücre popülasyonu elde edildi (Şekil 32) ve daha sonraki karakterizasyon, farklılaştırma ve doku uyumu testleri için donduruldu.



Şekil 31. kYDKMKH öncül koloniler, pasaj:0. Kültür kabına tutunan ve tutunmayan hücreler. İnverte mikroskop, 4X.

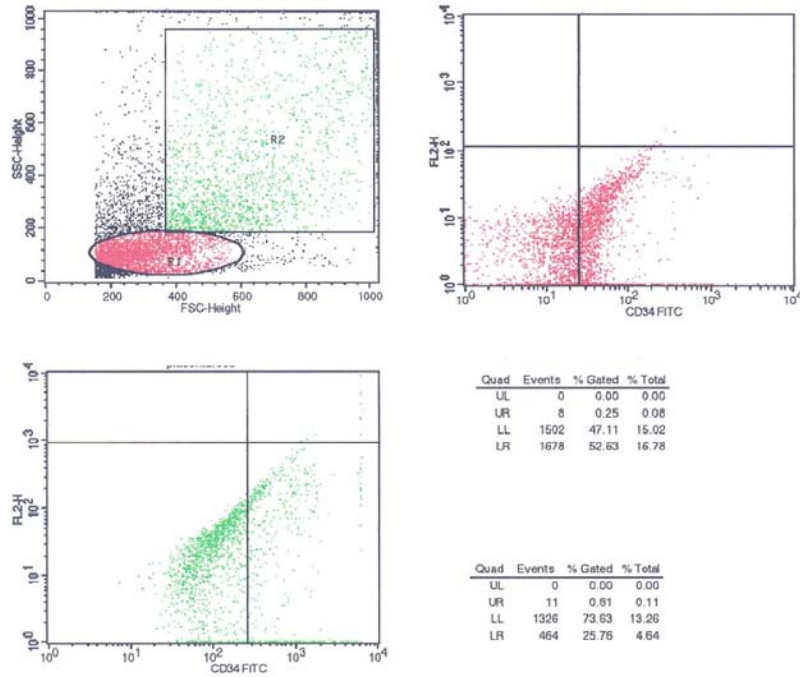


Şekil 32. KYDMKH ilerleyen kültürlerindeki görüntüsü, pasaj: 3. Hücreler homojen morfolojide ve fibroblastid tipte ve % 95 konfluent. İverted mikroskop, X10.

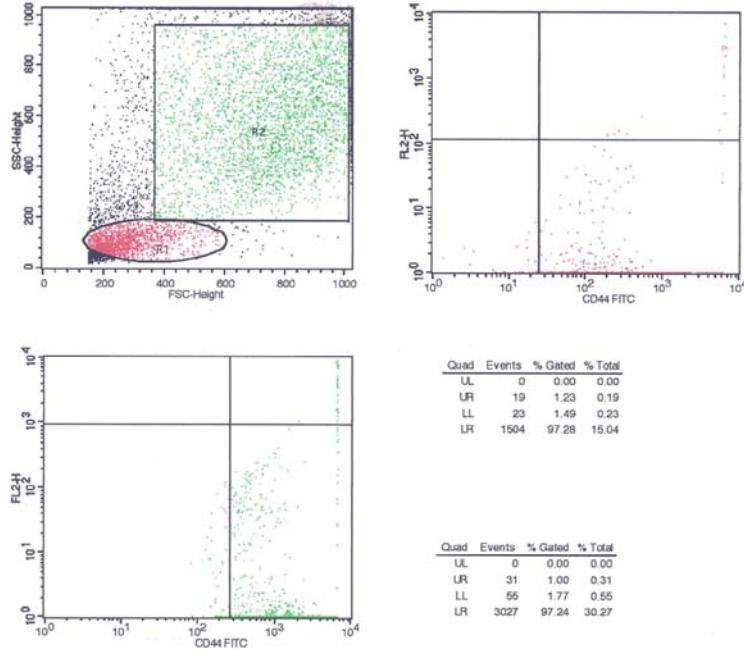
KYDKMK Hücrelerinin Karakterizasyonu

Flow Cytometry

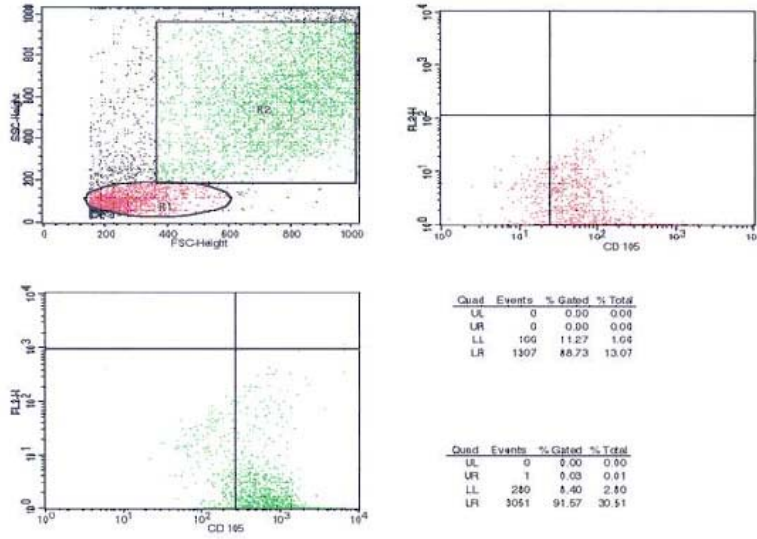
Hücrelerin, hematopoetik marker olan CD34 ekspresyonu yönünden negatif, MKH markerlarından CD44 ve CD 105 ekspresyonu yönünden pozitif oldukları görüldü (Şekil 33 a,b,c).



a.



b.



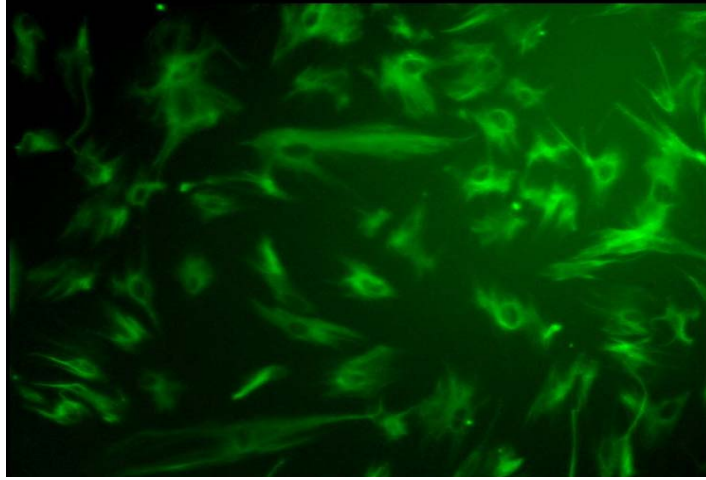
c.

Şekil 33. İzole edip 3-4. pasaja kadar kültüre edilen KYDKMK hücre dizilerinin flow sitometrik analiz ile belirlenen hücre yüzey belirteç ekspresyonları.

Histolojik İnceleme

İmmunfluoresan İşaretleme

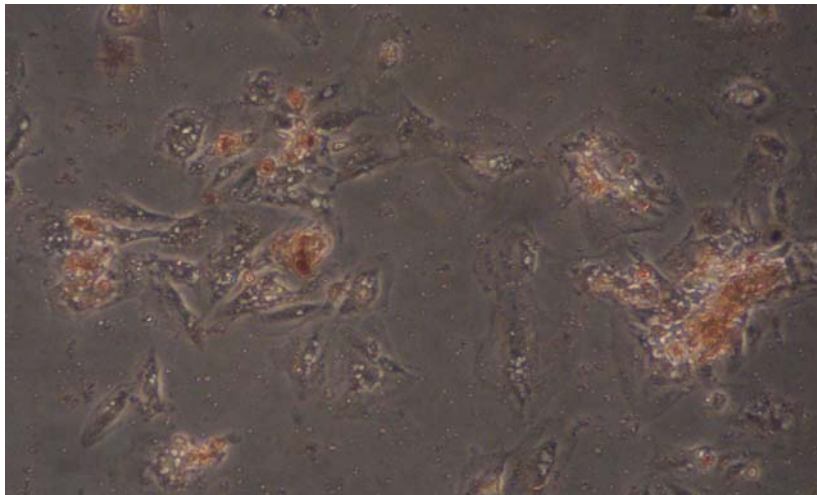
MKH karakterizasyonu için ise farklılaşmamış (p:1) hücreler fikse edildikten sonra, MHK işaretleyicilerinden ara filament olan vimentin ile immunfloresan işaretleme yapıldı. Mezenkimal kök hücrelere belirli işaretleyicilerden vimentin ile boyanmış KYDKMKH Şekil 34'de görülmektedir.



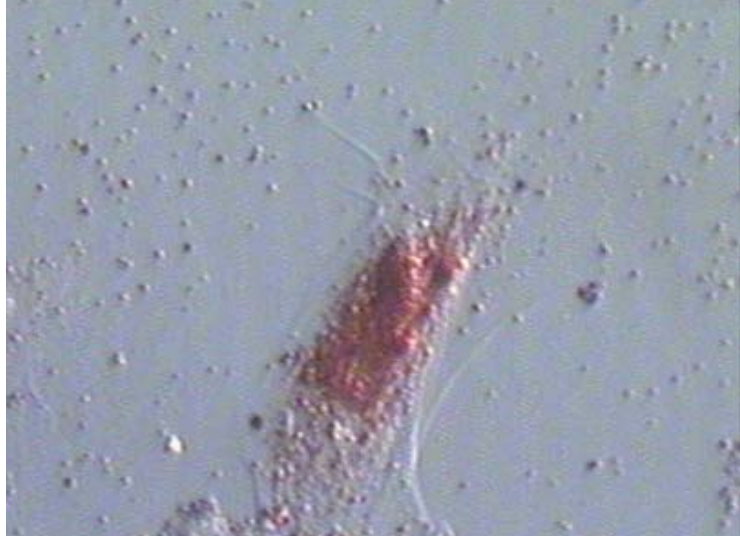
Şekil 34. Mezenkimal kök hücrelere belirli işaretleyicilerden vimentin ile boyanmış KYDKMKH. Yeşil ile boyanan kısımlar sitoplazmik intermediyer filament ekspresyonunu göstermektedir. Floresan mikroskop, X100.

KYDKMK Hücrelerinin Adipojenik ve Osteojenik Farklılaştırılması

Lipid vakuolleri içeren hücreler, ilk olarak yaklaşık olarak 1 hafta sonra gözlemlendi. 2 hafta sonra adipositler, oil-red O (Sigma) ile boyanmak üzere %1'lik paraformaldehitte fikse edildi. KYDKMK hücrelerinde adipojenik farklılaştırma sonrasında Oil red-O boyanarak hücrelerdeki lipid birikimi gözlemlendi (Şekil 35 ve 36).

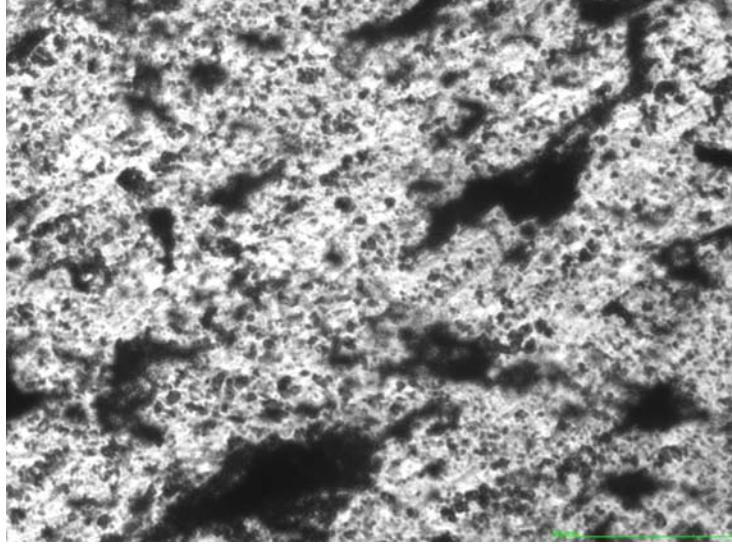


Şekil 35. KYDKMK hücrelerinde adipojenik farklılaştırma sonrasında Oil red-O boyanarak hücrelerdeki lipid birikimi gözlenmektedir. İverted mikroskop, X100.

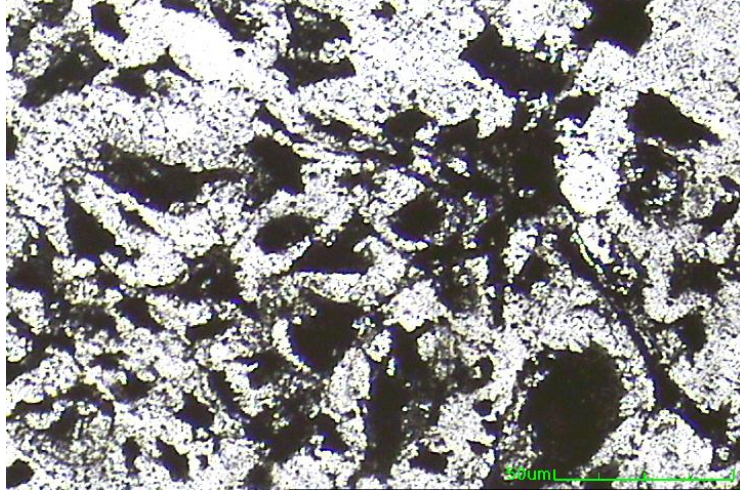


Şekil 36. KYDKMK hücrelerinde adipojenik farklılaştırma sonrasında Oil red-O boyanarak hücrelerdeki lipid birikimi gözlenmektedir. Inverted mikroskop, X400.

Osteojenik farklılaşma hücrelerde immünohistolojik olarak gösterildi. Şekil 37 ve Şekil 38'de KYDKMK hücrelerinde osteojenik farklılaştırma sonrasında von Kosa boyası ile mineralizasyon gözlenmektedir.



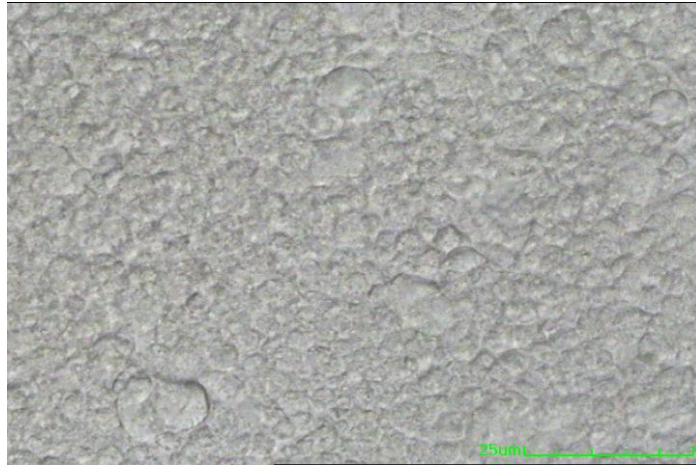
Şekil 37. KYDKMK hücrelerinde osteojenik farklılaştırma sonrasında von Kosa boyanarak mineralizasyon gözlenmektedir. Inverted mikroskop, X100.



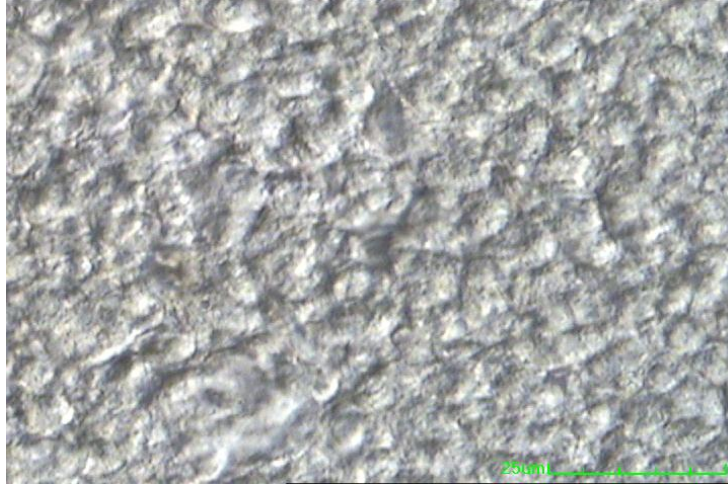
Şekil 38. KYDKMK hücrelerinde osteojenik farklılaştırma sonrasında von Kossa boyası ile mineralizasyon gözlenmektedir. İverted mikroskop, X400.

KYDKMK Hücrelerinin Kondrojenik Farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşmanın 21. günde gerçekleştiği saptandı. Mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşmanın sonunda KYDKMK hücreleri Şekil 39 ve Şekil 40'da görülmektedir.

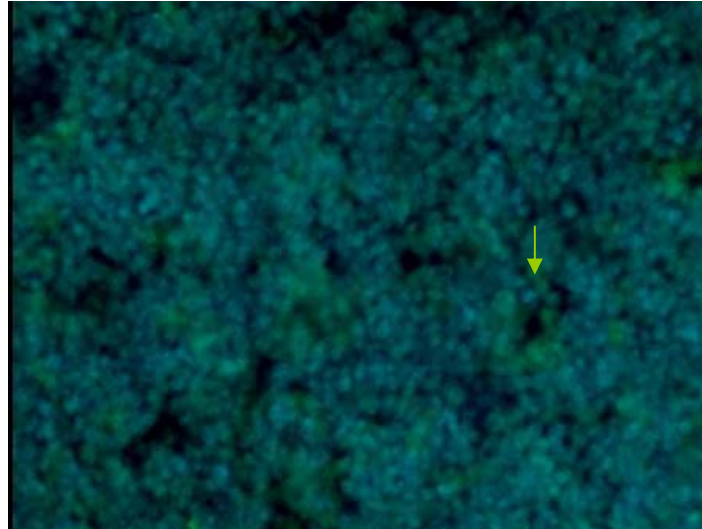


Şekil 39. KYDKMK hücreleri, mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşmanın sonunda. İverted mikroskop, X100.

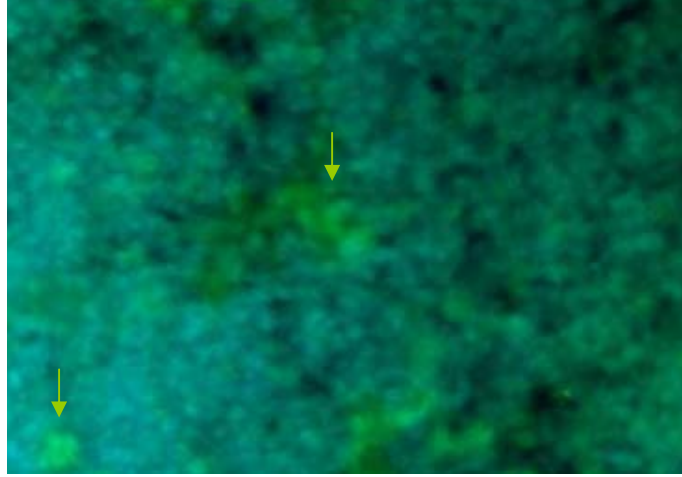


Şekil 40. KYDKMK hücreleri, mikropellet yapıldıktan sonra kültür ortamı içeren 35 mm'lik petri içerisinde kondrojenik farklılaşmanın sonunda. Inverted mikroskop, X400.

Daha sonra fikse edilip, 35 mm'lik petridekiler doğrudan boyanırken (Şekil 41); konik tüptekiler ise % 2'lik agar gömülerek rutin histolojik takibe alınarak parafine gömüldü. 5-6 μm 'lik kesitler alındıktan sonra Safranin O, alcian blue (pH 1.0) ve tip II kollajen için immunfluoresan teknikle boyandı.



Şekil 41. 35 mm'lik petri kabında kondrojenik farklılaştırma uygulanan KYDKMK hücrelerinin oluşturduğu mikropellette Tip II kollajen immunfluoresan işaretleme. (→) Okla gösterilen bölgeler kollajen Tip II bulunun ekstraselüler matriks alanlarıdır. Çekirdek boyası DAPI uygulanmıştır. Fluoresan mikroskop, X100.

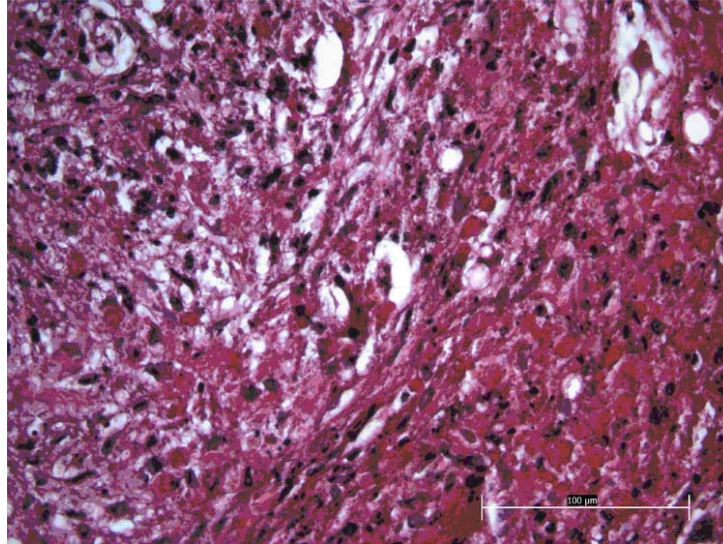


Şekil 42. 35 mm'lik petri kabında kondrojenik farklılaştırma uygulanan kYDKMK hücrelerinin oluşturduğu mikropette Tip II kollajen immunfloresan işaretleme. (→) Okla gösterilen bölgeler kollejen Tip II bulunun ekstraselüler matrix alanları. Çekirdek boyası DAPI uygulandı. Fluoresan mikroskop, X100.

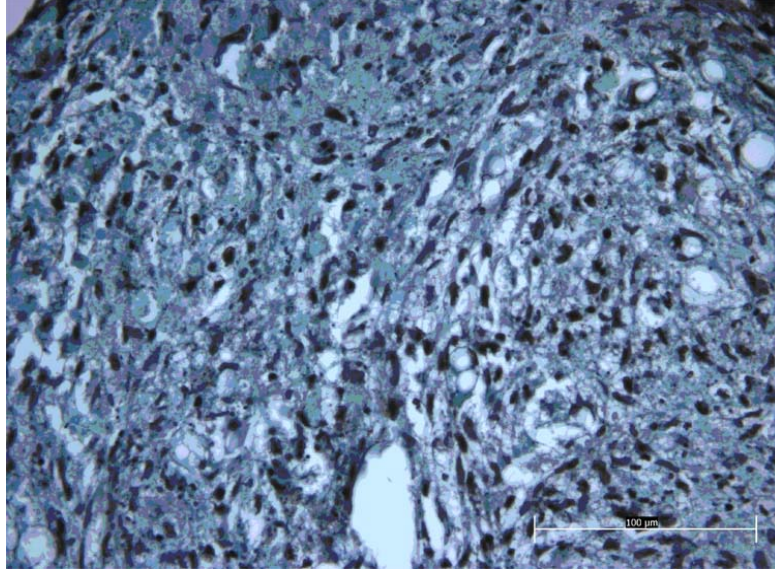
G) Doku Uyumluluğu Çalışmaları

Işık Mikroskobu

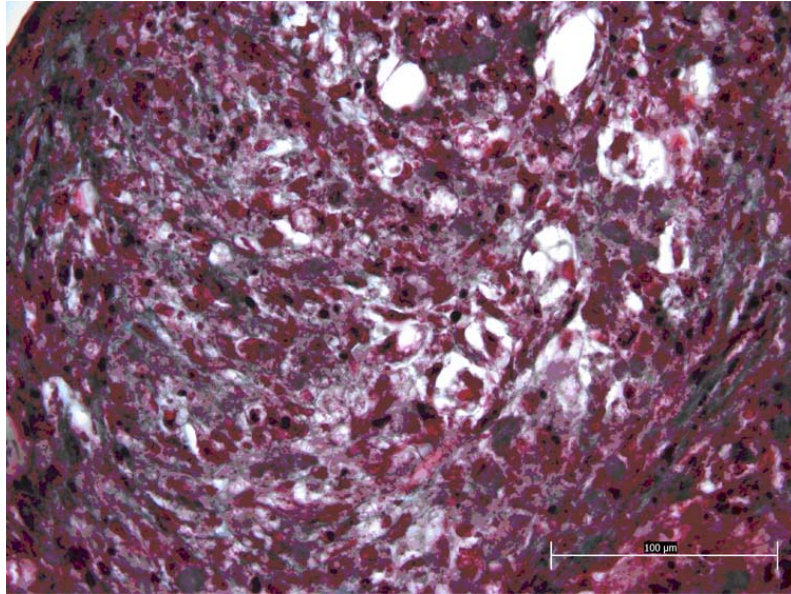
Hematoksilen eozinle oval, kısmen uzantılı hücreler izlendi. Masson trikromla hücrelerin arasındaki fibriller yapıdaki ekstrasellüler matriks gözlemlendi. Masson trikrom ve safranin o ile yeşil boyanan kollajen fibriller ara madde içinde izlendi (Şekil 43-45).



Şekil 43. Kondrositlerin sitoplazmaları ve kollajen fibriller pembe, hücre çekirdekleri mor renkte boyanmıştır. Hematoksilen eozin, X400



Şekil 44. Kondrositlerin çekirdekleri koyu mor-siyah, ara maddedeki kollagen fibriller yeşil renkte boyanmıştır. Masson trikrom, X400.

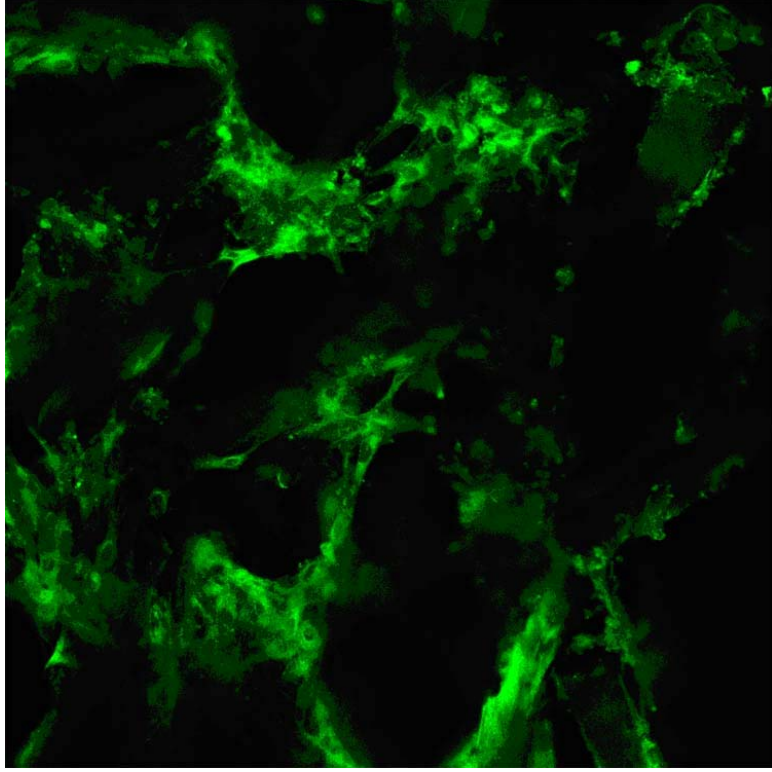


Şekil 45. Kondrositler kırmızı, ekstraselüler matriksteki kollagen fibriller gri-yeşil renkte boyanmıştır. Safranin O, X400.

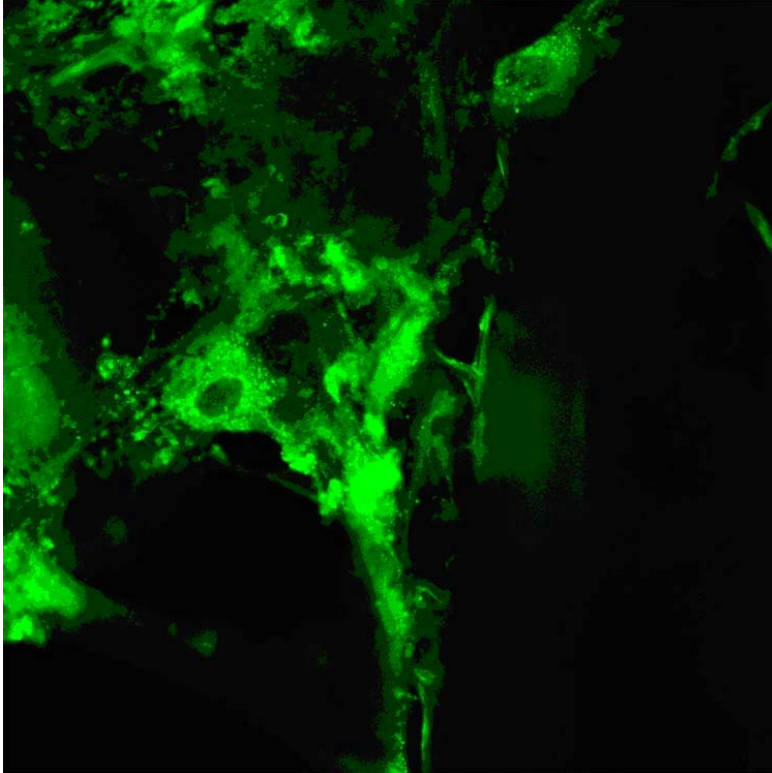
Konfokal mikroskopu

DiL boyasını alan canlı hücreler, biyomalzeme yüzeyinde gruplar halinde sitoplazmik uzantılarıyla görüntülendi.

Fluoresan işaretli canlı hücreler, polimer kompozit yüzeyinde ve gözeneklerinde izlendi. Şekil 46'da konfokal mikroskopta biyomalzemeye ait gözeneklerde uzanan çok sayıda hücre ve aralarındaki ekstraselüler matriks görülmektedir. Aynı biyomalzemenin daha büyük büyütmede konfokal mikroskopta DiL ile işaretli üç hücre biyomalzeme yüzeyinde sitoplazmik uzantıları ile birbiriyle ilişki halinde olduğu Şekil 47'de görülmektedir.



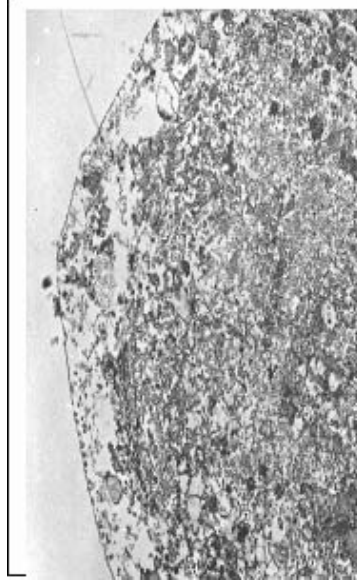
Şekil 46. Konfokal mikroskofta biyomalzemeye ait gözeneklerde uzanan çok sayıda hücre ve aralarındaki ekstraselüler matriks izlenmektedir. X100, DiL



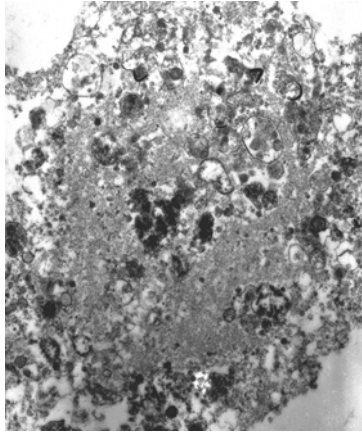
Şekil 47. Büyük büyütmede konfokal mikroskofta DiL ile işaretli üç hücre biyomalzeme yüzeyinde sitoplazmik uzantıları ile birbiriyle ilişki halindedir. X200

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde kondrositlerin sitoplazmalarının vezikül ve vakuollerden zengin olduğu izlendi. Hücrelerde yer yer glikojen taneciklerinin depolandığı saptandı. Mitokondriyonların kristalleri yer yer silinmişti. Çekirdek kromatin dağılımı çoğunlukla normal görünümdeydi. Bazı hücrelerin olasılıkla takip sırasında zar bütünlüğünü yitirdiği saptandı. Bu durum Şekil 48'de görülmektedir.



A

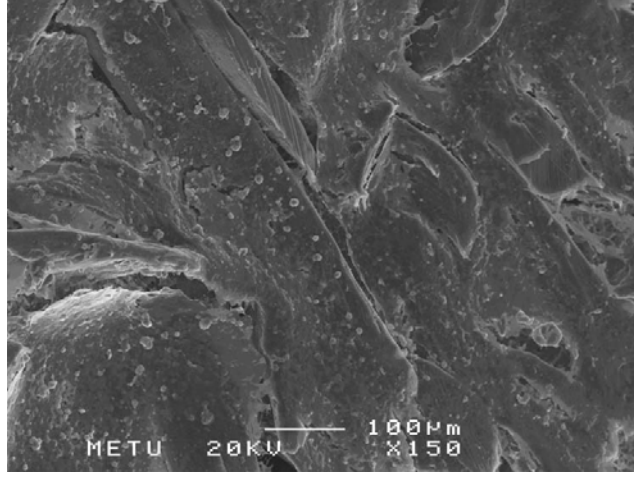


B

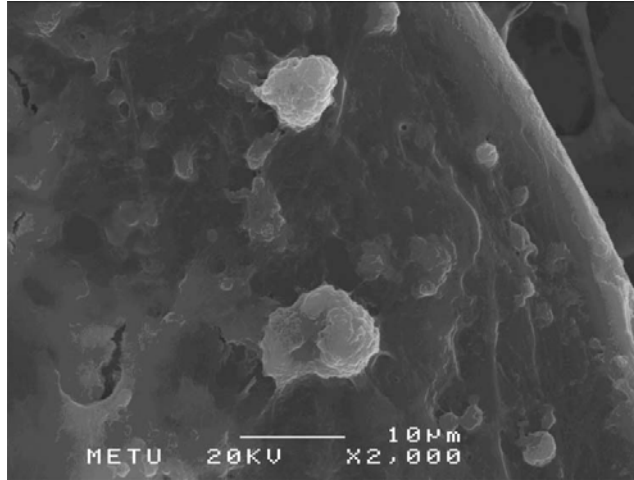
Şekil 48. A, B: Transmisyon elektronmikrograflarda mitokondriyonlar yer yer şişmiş görünümündedir. Takip prosedürüne bağlı olarak bazı kondrositlerde hücre zarı erimiştir. Hücreler lizozomlar vezikül ve vakuollerden zengin görünümündedir.

Tarama elektron mikroskobu (SEM)

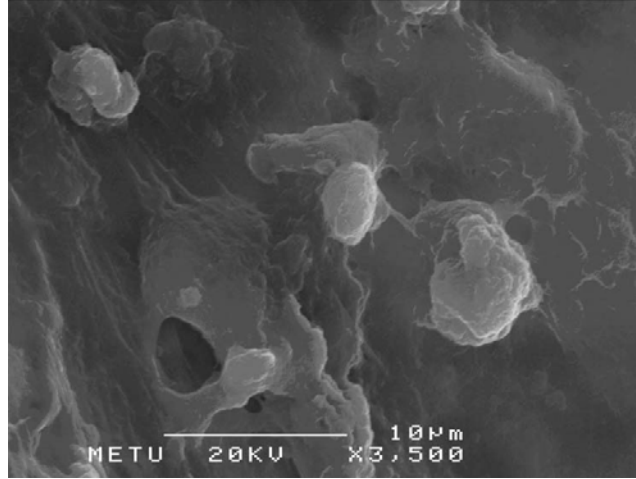
Gözenekli biyomalzeme yüzeyinde gruplar halinde kondrositler ve aralarını yer yer dolduran ekstraselüler matriks gözlemlendi (Şekil 49-52).



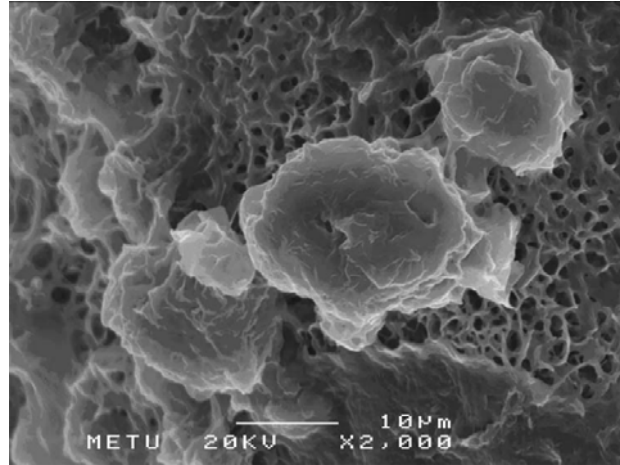
Şekil 49. Küçük büyütmede biyomalzemenin yüzeyi boyunca tutunmuş yuvarlak hücreler izlenmektedir. X150



Şekil 50. Büyük büyütmede malzeme yüzeyine sitoplazmik uzantıları ile tutunmuş ve matriks sentezlemiş yuvarlak kondrositler izlenmektedir. X2000



Şekil 51. Biyomalzemenin gözeneklerine oturmuş kondrositler ve yüzeye salgıladıkları ara madde izlenmektedir. X3500



Şekil 52. Malzemenin gözenekli mikroyapısı izlenmektedir, X2000.

GENEL SONUÇLAR

Çalışmanın varsayımları, amaçları ve kapsamı gözönüne alındığında

- a) TCP ve HAP tozlarının üretilebildiği,
- b) bunlarla Si ve Sr'nin birleştirilebildiği,
- c) Si ve Sr katkısının HAP+TCP bileşiğinin XRD diyagramında değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır.

HAP+TCP kompozitinin eldesinde ideal pişirme sıcaklığının 1200 °C ve sinterleme süresinin 2-4 saat olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen üretim yöntemi ile cam fazı eşliğinde sinterlenmiş olan HAP+TCP seramikler makroskopik ve mikroskopik yapıları itibarıyla subkondral kemiği örneklemektedir. Gözenek boyutları ortalama 700 µm civarındadır. Gözenekler arası kanalların çapları 100 µm ile 400 µm arasında değişmektedir. Seramiklerin gözenek oranı % 70'dir. Bu yapı kemiğe uygulandığında hücrelerin kemik içerisine ilerlemesi için idealdir. Biyomekanik test sonuçları incelendiğinde HAP+TCP kompozitlerinin basma dayanımları 104 MPa iken Si ve Sr katkısının basma dayanımını 110 MPa'a çıkarttığı belirlenmiştir.

Günümüzde klinik uygulamada da yaygın kullanım alanı bulan biyoseramiklerin en önemli sorunlarından birisi yerini hızla normal dokuya bırakma oranının düşük olmasıdır. HAP seramikler gözenek oranı ve yapısına bağlı olarak yılda % 3 oranında yerini normal dokuya bırakırken bu oran gözenekli TCP de % 40-60 oranına çıkmaktadır. Çoğunlukla kemik ile temasta olan yüzeylerden seramiğin içerisine hücre girişi olduğundan seramiğin orta bölgeleri çok geç dönemde doku ile yer değiştirmektedir. Bu süreci hızlandırmak için bu araştırmada seramiklerin içerisine makrokanallar açılmıştır. Üretim teknolojisi olarak kanalların açılmasında seramiğin yapısının bozulmaması için soğutma kuru hava ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek ısıya dayanıklı karbür kesici takımlar kullanılarak 0,1 mm'lik adımlarla delme gerçekleştirilmiştir. İdeal dömen hızı olarak 5000 rpm belirlenmiştir.

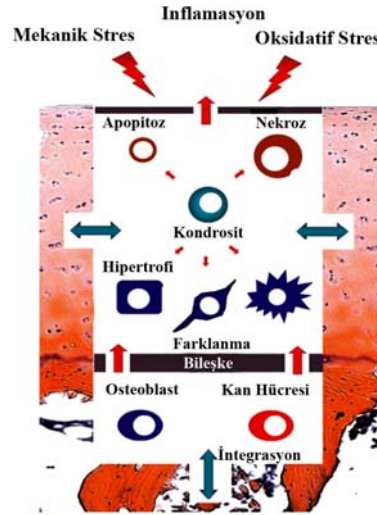
Biyopolimerler a) seramiğin kollajen bileşenini örneklemek ve b) kırıkta hücrelerini taşıyabilmek için iki farklı amaçla kullanılmıştır. Kollajen bileşeni örneklemek için iki aşamalı kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Polimer ile kaplama sonunda seramiklerin basma dayanımlarının 3 katı arttığı izlenmiştir.

Polimerden deksametazon salımı izlendiğinde 8 haftada molekülün % 75'inin ortama çıktığı görülmektedir. VEGF'in seramik integrasyonunu tetiklediği düşünüldüğünden bu oranda salımın seramiğin içerisine damar yapıcı hücrelerin hızla ilerlemesini sağlayacağı ve integrasyonu arttıracığı düşünülmektedir.

Kırıkta doku mühendisliğinde başarısızlık nedenleri Şekil 53'te görüldüğü gibi

- a) Aktarılan hücrelerin kaybı,
- b) Apoptoz veya nekroz,
- c) Farklanma eksikliği (Fibroblastik, Hipertrofik ve Osteojenik),
- d) Ağ hasarı (Mekanik, Oksidatif, İnflamatuvar stress) ve
- e) İntegrasyon eksikliği olarak bildirilmektedir (Steinert ve ark., 2007).

2005 yılında yayımlanan bir çalışmada (Torun-Köse, 2005) integrasyon eksikliği normal doku ile yapay kırıkta arasında demarkasyon hattı şeklinde tarafımızdan da izlenmiştir. Kırıkta eklem yüzünü örneklemek amacıyla bu çalışmada polikaprolakton kullanılmıştır. Hazırlanan polikaprolakton polimerik ağ % 75 oranında ve 100-300 µm boyutlarında gözenekli yapıya sahiptir.



Şekil 53. Kıkırdak doku mühendisliğinde başarısızlık nedenleri.

Bu çalışmada yağ dokusundan başarıyla hücre izole edilmiş ve kıkırdak hücresine farklılaştırılmıştır. Elde edilen hücrelerin akışkan sitometresinde hematopoetik işaretleyici olan CD34 yönünden negatif, mezenşimal kök hücre işaretleyicilerinden CD44 ve CD 105 ekspresyonu yönünden pozitif oldukları görülmüştür. Bu hücreler ayrıca vimentin ile başarıyla boyanmıştır. Hücrelerde kondrojenik farklılaşma 3. haftada gerçekleşmiştir. İmmünofloresan işaretlemeye hücrelerin hücrelerarası ağda tip 2 kollajeni sentezledikleri gösterilmiştir.

Hücre ile birleştirilen biyomalzemelerin ışık, TEM, SEM ve konfokal mikroskopide uyumlu oldukları izlenmiştir. DİL boyası ile biyomalzemelerin üzerinde büyüyen hücrelerin canlılıklarını korudukları ve sitoplazmik uzantılarını oluşturdukları saptanmıştır. Hücrelerin ayrıca biyomalzemenin derin gözeneklerine ilerledikleri belirlenmiştir.

Özet olarak gerçekleştirilen bu çalışmada kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılacak Sr-Si-HAP+TCP seramik elde edilmiş, bu seramiğe makrokanallar açılma yöntemi belirlenmiş, polimerle güçlendirilmiş, polimerden sinyal molekülünün kontrollü salımı başarılı, kıkırdağı örnekleyecek polikaprolakton geliştirilmiş, yağ dokusundan kıkırdak hücreleri farklılaştırılmış ve doku uyumluluğu kanıtlanmıştır.

Bu çalışmanın en önemli kısıtı in vivo deneylerin gerçekleştirilmemiş olmasıdır. Gelecekte gerçekleştirilecek çalışmada in vivo deneylerin yanısıra hücre kültüründe eser element dozunun proliferasyon ve mineralizasyona etkisi araştırılmalıdır.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

AKÇİN, O., Findikli, N., Kahraman, S., Candan, Z., Isolation, Establishment and In Vitro Differentiation Potential of Three Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Lines From Caesaerian Section, *Fertil Steril.*, 84, S456-S457, (2005).

ARAS, NK., Yılmaz, G., Alkan, S., Korkusuz, F., Trace elements in human bone determined by neutron activation analysis. *J Radioanal Nuc Chem.*, 239, 79-86, (1999).

ARAS, NK., Yılmaz, G., Korkusuz, F., Ölmez, İ., Sepici, B., Ekşioğlu, F., Bode, P., Multielement analysis of iliac crest bone by neutron activation. *J Radioanal Nuc Chem.*, 244, 185-188, (2000).

BALÇIK, C., Tokdemir, T., Senköylü, A., Koç, N., Timuçin, M., Akin, S., Korkusuz, P., Korkusuz, F., Early weight bearing of porous HA/TCP (60/40) ceramics in vivo: a longitudinal study in a segmental bone defect model of rabbit. *Acta Biomater.*, 3, 6, 985-96, (2007).

BEHRENS, P., Bitter, T., Kurz, B., Russlies. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)—5-year follow-up. *The Knee*, 13, 194-202, (2006).

BOLAND, ED., Espy, PG., Bowlin, GL., Tissue Engineering Scaffolds. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, DOI: 10.1081/E-EBBE 120005552.

Bone and Joint Decade. (<http://www.boneandjointdecade.org/>)

BREINAN, HA., Minas, T., Hsu, HP., Nehrer, S., Shortkroff, S., Spector, M., Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res.*, 19, 3, 482-92, (2001).

BROWNE, JE., Anderson, AF., Arciero, R., Mandelbaum, B., Moseley, JB., Micheli, LJ., Fu, F., Erggelet, C., Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin Orthop Rel Res.*, 436, 237-245, (2005).

CORREIA, RN., Magalhaes, MC., Marques, PAPP., Senos, AMR., Wet synthesis and characterisation of modified hydroxyapatite powders. *J Mat Sci.*, 7, 501-505, (1996).

FINDIKLI, N., Kahraman, S., Akcin, O., Sertyel, S., Candan, Z., Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines. *Reprod Biomed Online*, 10, 617-627, (2005).

GALLAY, SH., Miura, Y., Commisso, CN., Fitzsimmons, JS., O'Driscoll, SW., Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J Orthop Res.*, 12, 4, 515-25, (1994).

GAO, J., Dennis, JEç, Solchaga, LA., Awadallah, AS., Goldberg, VM., Caplan, AL., Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, 7, 4, 363-71, (2001).

GAO, J., Dennis, JE., Solchaga, LA., Goldberg, VM., Caplan, Al., Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge. *Tissue Eng.*, 8, 5, 827-37, (2002).

GIGANTE, A., Bevilacqua, C., Ricevuto, A., Mattioli-Belmonte, M., Greco, F., Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 15, 88–92, (2007).

- HAYEK, E., Newesley, H., Pentacalcium monohydroxyorthophosphate. *Inorg Syn*, 7, 63-65, (1963).
- HİCOK, KC., Du Laney, TV., Zhou, YS. ve ark., Human adipose-derived stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Engineering*, 10, 371-380, (2004).
- HUNG, CT., LeRoux, MA., Palmer, GD., Chao, PH., Lo, S., Valhmu, WB., Disparate aggrecan gene expression in chondrocytes subjected to hypotonic and hypertonic loading in 2D and 3D culture. *Biorheology*, 40, 1-3, 61-72, (2003).
- HUNZİKER, EB., Driesang, IM., Functional barrier principle for growth-factor-based articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 5, 20-7, (2003).
- HUNZİKER, EB., Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Rel Res.*, 367, S135-S146, (1999).
- JONES, CW., Willers, C., Keogh, A., Smolinski, D., Fick, D., Yates, PJ., Kirk, TB., Zheng, MH., Matrix-Induced Autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy. *J Orthop Res.*, 26, 292-303, (2008).
- KERMAN, G., Korkusuz, P., Hakki, SS., Purali, N., Koc, N., Timucin, M., Korkusuz, F., Observation of MC3T3-E1 cells applied bioceramics by scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy (CM). 11th Annual Seminar and Meeting of Ceramics, Cells and Tissues, Faenza, Italy, October 2-5, (Abstract book pp. 11), (2007).
- KOÇ, N., Timuçin, M., Korkusuz, F., Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramic as bone substitutes. *Key Eng Mat.*, 254-256, 949-952, (2004).
- KOÇ, N., Timuçin, M., Korkusuz, F., Fabrication and characterization of porous tricalcium phosphate ceramics. *Ceramics International*, 30, 205-211, (2004).
- LEE, SH., Shin, H., Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 59, 339-359, (2007).
- LENDENCKEL, S., Jödicke, A., Christophis, P. ve ark., Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 32, 370-373, (2004).
- LYNN, AK., Brooks, RA., Bonfield, W., Rushton, N., Repair of defects in articular joints. Prospects for material-based solutions in tissue engineering. *J Bone Joint Surg Br.*, 86, 8, 1093-9, (2004).
- MARTİN, I., Miot, S., Barbero, A., Jakob, M., Wendt, D., Osteochondral tissue engineering. *J. of Biomechanics*, 40, 750-765, (2007).
- MITHÖFER, K., Peterson, L., Mandelbaum, BR., Minas, T., Articular cartilage repair in soccer players with autologous chondrocyte transplantation. *Am. J Sports Med.*, 33, 11, 1639-46, (2005).
- NAKAHARA, H., Goldberg, VM., Caplan, AL., Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res.*, 9, 4, 465-76, (1991).

NIEDERAUER, GG., Slivka, MA., Leatherbury, NC., Korvick, DL., Harroff, HH., Ehler, WC., Dunn, CJ., Kieswetter, K., Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials*, 21, 24, 2561-74, (2000).

O'DRISCOLL, SW., Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin Orthop Rel Res.*, 367S, S186-S203, (1999).

PETERSON, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Akerlund, EL., Lindahl, A., Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am. J. Sports Med.*, 30, 1, 2-12, (2002).

PETERSON, B., Zhang, J., Iglesias, R. ve ark., Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Engineering*, 11, 120-129, (2005).

PLANAT-BENARD, V., Menard, C., Andre, M. ve ark., Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stromal cells. *Circulation Research*, 94, 223-229, (2004).

PURALI, N., Hücre elektrofizyolojisi ve görüntülemenin temelleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları (basımda), (2008).

RODRÍGUEZ, AM., Elabd, C., Amri, EZ. ve ark., The human adipose tissue is a source of multipotent cells, *Biochimie*, 87, 125-128, (2005).

SCHAEFER, D., Martin, I., Jundt, G., Seidel, J., Heberer, M., Grodzinsky, A., Bergin, I., Vunjak-Novakovic, G., Freed, LE., Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum.*, 46, 9, 2524-34, (2002).

SHERWOOD, JK., Riley, SL., Palazzolo, R., Brown, SC., Monkhouse, DC., Coates, M., Griffith, LG., Landeen, LK., Ratcliffe, A., A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*, 23, 24, 4739-51, (2002).

STEINERT, AF., Ghivizzani, SC., Rethwilm, A., Tuan, RS., Evans, CH., Nöth, U., Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, 9, 213, (2007).

TAŞ, AC., Korkusuz, F., Timuçin, M., Akkaş, N., An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behavior of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *J Mat Sci: Mat Med.*, 8,91-96, (1997).

The Burden of Musculoskeletal Diseases. (www.boneandjointburden.org)

TORUN-KÖSE, G., Korkusuz, F., Özkul, A., Soysal, Y., Özdemir, T., Yıldız, C., Hasirci, V., Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials*, 26, 5187-5197, (2005).

YANG, M., Ma, QJ., Dang, GT. ve ark., In vitro and in vivo induction of bone formation based on ex vivo gene therapy using rat adipose-derived adult stem cells expressing BMP-7. *Cytherapy*, 7, 273-281, (2005).

YAYLAOĞLU, MB., Yildiz, C., Korkusuz, F., Hasirci, V., A novel osteochondral implant. *Biomaterials*, 20, 1512-20, (1999).

ZUK, PA., Zhu, M., Muzino, H. ve ark. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7, 211-228, (2001).

ZUK, PA., Zhu, M., Ashjian, P. ve ark., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell.*, 13, 4279-4295, (2002).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 106M063
Proje Başlığı: Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Yağ Dokusundan Farklılandırılmış Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit İçeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Abdullah Öztürk (Yürütücü) Prof. Dr. Muharrem Timuçin Prof. Dr. Erdal Bayramlı Prof. Dr. Semra Kahraman Prof. Dr. Feza Korkusuz Doç. Dr. Petek Korkusuz Y. Doç. Dr. Caner Durucan Zafer Nihat Candan
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nin Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Kimya Bölümü ve Sağlık ve Rehberlik Merkezi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AbD İstanbul Memorial Hastanesi YGÜ Birimi
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Gamet Medikal Hizmetler AŞ Fame-Med Medikal AŞ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/08/2006 – 01/05/2008
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu çalışmada kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılabilir Sr-Si-HAP+TCP seramik elde edilmiş, bu seramiğe makrokanallar açılma yöntemi belirlenmiş, polimerle güçlendirilmiş, polimerden sinyal molekülünün kontrollü salımı başarılmış, kıkırdağı örnekleyecek polikaprolakton geliştirilmiş, yağ dokusundan kıkırdak hücreleri farklılandırılmış ve doku uyumluluğu kanıtlanmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler: biyomalzeme, hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat, polimer, hücre kültürü, kemik, kıkırdak, doku mühendisliği
Projeden Yapılan Yayınlar: <p>Proje sonuçlarının uluslararası saygın dergilerde yayınlanması ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulması ancak patent başvurusunun ardından gerçekleşebilecektir.</p>

BÜTÇE RAPOR

Kurulu Adı : 106M063 Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Ya Dokusundan Farklılandırılmı Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit çeren
Yapay Dokuların G
Cari Yıl : 2005

HESAP KODU	GELİR HESAP ADI	TUTAR	HESAP KODU	GİDER HESAP ADI	TUTAR	KALAN
800.03.2.9.90	Diğer Tüketim Mal ve Malzemesi Alımları	45.000,00	830.03.2.9.90	Diğer Tüketim Mal ve Malzemesi Alımları	41.449,08	3.550,92
800.03.3.1.01	Yurtiçi Geçici Görev Yollukları	2.000,00	830.03.3.1.01	Yurtiçi Geçici Görev Yollukları	2.000,00	0,00
800.03.3.3.01	Yurtdışı Geçici Görev Yollukları	2.000,00	830.03.3.3.01	Yurtdışı Geçici Görev Yollukları	2.000,00	0,00
800.03.5.9.90	Diğer Hizmet Alımları	15.000,00	830.03.5.9.90	Diğer Hizmet Alımları	15.000,00	0,00
800.05.4.1.01	Yurtiçi Burslar ve Harçlıklar	28.500,00	830.05.4.1.01	Yurtiçi Burslar ve Harçlıklar	28.500,00	0,00
800.06.1.2.90	Diğer Makine Teçhizat Alımları	10.750,00	830.06.1.2.90	Diğer Makine Teçhizat Alımları	9.590,40	1.159,60
800.07.1.5.90	Diğer	20.450,00	830.07.1.5.90	Diğer	20.450,00	0,00
	TOPLAM	123.700,00		TOPLAM	118.989,48	4.710,52

YARDIMCI DEFTER

Kurulu Adı : Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Ya Dokusundan Farklılandırılmış Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit çeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi
 Cari Yıl : 2005
 Ba langıç Hesap Kodu : 800 Ba langıç Tarihi : 01.01.2005
 Biti Hesap Kodu : 9 Biti Tarihi : 24.07.2008

800. BÜTÇE GELİR HESAPLARI				0,00	123.700,00
800.03. MAL VE HİZMET ALIM GİDERLERİ				0,00	64.000,00
800.03.2. TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI				0,00	45.000,00
800.03.2.9. Diğer Tüketim Mal ve Malzemesi Alımları				0,00	45.000,00
800.03.2.9.90. Diğer Tüketim Mal ve Malzemesi Alımları				0,00	45.000,00
<i>F NO</i>	<i>YEVİM YERİ NO</i>	<i>F AÇIKLAMA</i>	<i>DURUM</i>	<i>BORÇ</i>	<i>ALACAK</i>
2		2006-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	45.000,00
800.03.3. YOLLUKLAR				0,00	4.000,00
800.03.3.1. Yurtiçi Geçici Görev Yollukları				0,00	2.000,00
800.03.3.1.01. Yurtiçi Geçici Görev Yollukları				0,00	2.000,00
<i>F NO</i>	<i>YEVİM YERİ NO</i>	<i>F AÇIKLAMA</i>	<i>DURUM</i>	<i>BORÇ</i>	<i>ALACAK</i>
2		2006-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	2.000,00
800.03.3.3. Yurtdışı Geçici Görev Yollukları				0,00	2.000,00
800.03.3.3.01. Yurtdışı Geçici Görev Yollukları				0,00	2.000,00
<i>F NO</i>	<i>YEVİM YERİ NO</i>	<i>F AÇIKLAMA</i>	<i>DURUM</i>	<i>BORÇ</i>	<i>ALACAK</i>
2		2006-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	2.000,00
800.03.5. HİZMET ALIMLARI				0,00	15.000,00
800.03.5.9. Diğer Hizmet Alımları				0,00	15.000,00
800.03.5.9.90. Diğer Hizmet Alımları				0,00	15.000,00
<i>F NO</i>	<i>YEVİM YERİ NO</i>	<i>F AÇIKLAMA</i>	<i>DURUM</i>	<i>BORÇ</i>	<i>ALACAK</i>
2		2006-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	15.000,00
800.05.4. HANE HALKINA YAPILAN TRANSFERLER				0,00	28.500,00
800.05.4.1. Burslar ve Harçlıklar				0,00	28.500,00
800.05.4.1.01. Yurtiçi Burslar ve Harçlıklar				0,00	28.500,00
<i>F NO</i>	<i>YEVİM YERİ NO</i>	<i>F AÇIKLAMA</i>	<i>DURUM</i>	<i>BORÇ</i>	<i>ALACAK</i>
2		2006-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	20.000,00
43		2007-1.donem Fi i	Onaylı	0,00	7.500,00
87		2007-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	1.000,00

YARDIMCI DEFTER

Kurulu Adı : Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Ya Dokusundan Farklılandırılmış Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit çeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi

Cari Yıl : 2005

Bağlanış Hesap Kodu : 800

Bitiş Hesap Kodu : 9

Bağlanış Tarihi : 01.01.2005

Bitiş Tarihi : 24.07.2008

800.06. SERMAYE G DERLER				0,00	10.750,00
800.06.1. MAMUL MAL ALIMLARI				0,00	10.750,00
800.06.1.2. Büro ve Ofisi Yeri Makine Teçhizat Alımları				0,00	10.750,00
800.06.1.2.90. Diğer Makine Teçhizat Alımları				0,00	10.750,00
F NO	YEVMIYE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
2		2006-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	10.750,00
800.07. SERMAYE TRANSFERLER				0,00	20.450,00
800.07.1. YURT ÇER SERMAYE TRANSFERLER				0,00	20.450,00
800.07.1.5. Diğer Sermaye Transferleri				0,00	20.450,00
800.07.1.5.90. Diğer				0,00	20.450,00
F NO	YEVMIYE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
43		2007-1.donem Fi i	Onaylı	0,00	18.950,00
87		2007-2.donem Fi i	Onaylı	0,00	1.500,00
830. BÜTÇE G DER HESAPLARI				118.989,48	0,00
830.03. MAL VE HİZMET ALIM G DERLER				60.449,08	0,00
830.03.2. TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI				41.449,08	0,00
830.03.2.9. Diğer Tüketim Mal ve Malzemesi Alımları				41.449,08	0,00
830.03.2.9.90. Diğer Tüketim Mal ve Malzemesi Alımları				41.449,08	0,00
F NO	YEVMIYE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
36		BETA LAB.F RMASINDAN LAB.MALZEMESİ ALIMI	Onaylı	1.263,78	0,00
27		AVANS MAHSUBU(789,42)	Onaylı	789,42	0,00
55		AVANS MAHSUBU	Onaylı	10.041,73	0,00
94		4 KALEM KİMYASAL MALZ.	Onaylı	21.664,80	0,00
99		sarf malzemesi	Onaylı	500,00	0,00
100		SARF MALZ.ALIMI VE BU SARFLAR ÇİN NAKLİYE BEDEL	Onaylı	1.500,00	0,00
116		SARF MALZ.	Onaysız	5.689,35	0,00
830.03.3. YOLLUKLAR				4.000,00	0,00
830.03.3.1. Yurtiçi Geçici Görev Yollukları				2.000,00	0,00

YARDIMCI DEFTER

Kurulu Adı : Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Ya Dokusundan Farklılandırılmış Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit çeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi

Cari Yıl : 2005

Bağlanış Hesap Kodu : 800

Bitiş Hesap Kodu : 9

Bağlanış Tarihi : 01.01.2005

Bitiş Tarihi : 24.07.2008

830.03.3.1.01. Yurtiçi Geçici Görev Yollukları **2.000,00** **0,00**

F NO	YEV M YE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
123		AVANS MAHSUBU	Onaysız	1.000,00	0,00
124		AVANS MAHSUBU	Onaylı	1.000,00	0,00

830.03.3.3. Yurtdışı Geçici Görev Yollukları **2.000,00** **0,00**

830.03.3.3.01. Yurtdışı Geçici Görev Yollukları **2.000,00** **0,00**

F NO	YEV M YE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
97		PETEK KORKUSUZ YURTDIŞI KONGRE KATILIMI	Onaylı	1.000,00	0,00
98		FEZA KORKUSUZ YURTDIŞI KONGRE KATILIMI	Onaylı	1.000,00	0,00

830.03.5. HİZMET ALIMLARI **15.000,00** **0,00**

830.03.5.9. Diğer Hizmet Alımları **15.000,00** **0,00**

830.03.5.9.90. Diğer Hizmet Alımları **15.000,00** **0,00**

F NO	YEV M YE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
96		NKÜBATÖR KİRALANMASI	Onaylı	15.000,00	0,00

830.05.4. HANE HALKINA YAPILAN TRANSFERLER **28.500,00** **0,00**

830.05.4.1. Burslar ve Harçlıklar **28.500,00** **0,00**

830.05.4.1.01. Yurtiçi Burslar ve Harçlıklar **28.500,00** **0,00**

F NO	YEV M YE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
3		AYCAN GÜNAY AUSTOS-EYLÜL	Onaylı	1.000,00	0,00
4		DAR ÇINAR EYLÜL	Onaylı	500,00	0,00
7		AYCAN GÜNAY EKİM	Onaylı	500,00	0,00
10		S DAR ÇINAR	Onaylı	500,00	0,00
13		AYCAN GÜNAY KASIM	Onaylı	500,00	0,00
14		OZAN CAN ÇAKAL AUSTOS-EYLÜL	Onaylı	1.000,00	0,00
18		S DAR ÇINAR ARALIK	Onaylı	500,00	0,00
23		S DAR ÇINAR OCAK	Onaylı	500,00	0,00
25		AYCAN GÜNAY ARALIK OCAK	Onaylı	1.000,00	0,00
28		DAR ÇINAR NİSAN	Onaylı	500,00	0,00
30		S DAR ÇINAR(T.C.594 253 689 129)	Onaylı	500,00	0,00

YARDIMCI DEFTER

Kurulu Adı : Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Ya Dokusundan Farklılandırılmış Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit çeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi
 Cari Yıl : 2005
 Ba langıç Hesap Kodu : 800 Ba langıç Tarihi : 01.01.2005
 Biti Hesap Kodu : 9 Biti Tarihi : 24.07.2008

31	AYCAN GÜNAY(T.C.316 217 964 54)	Onaylı	1.000,00	0,00
37	DAR ÇINAR N SAN 2007 594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
39	GÖZDE KERMAN MART 2007-127 978 247 52	Onaylı	1.000,00	0,00
41	AYCAN GÜNAY N SAN MAYIS 2007-316 217 964 54	Onaylı	1.000,00	0,00
42	S DAR ÇINAR MAYIS 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
46	GÖZDE KERMAN nisan mayıs 2007-127 978 247 52	Onaylı	2.000,00	0,00
48	S DAR ÇINAR HAZ RAN AYI BURS ÖDEMES	Onaylı	500,00	0,00
49	AYCAN GÜNAY HAZ RAN AYI BURS ÖDEMES	Onaylı	500,00	0,00
50	GÖZDE KERMAN HAZ RAN 127 978 247 52	Onaylı	1.000,00	0,00
56	DAR ÇINAR TEMMUZ 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
58	AYCAN GÜNAY TEMMUZ BURS U (31621796454)	Onaylı	500,00	0,00
60	S DAR ÇINAR A USTOS 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
62	GÖZDE KERMAN TEMMUZ A USTOS 2007-127 978 247 52	Onaylı	2.000,00	0,00
68	DAR ÇINAR EYLÜL 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
69	AYCAN GÜNAY A USTOS EYLÜL 2007-316 217 964 54	Onaylı	1.000,00	0,00
74	GÖZDE KERMAN EYLÜL 2007-127 978 247 52	Onaylı	1.000,00	0,00
80	DAR ÇINAR EK M 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
84	AYCAN GÜNAY EK M 2007-316 217 964 54	Onaylı	500,00	0,00
91	GÖZDE KERMAN EK M 2007-127 978 247 52	Onaylı	1.000,00	0,00
93	DAR ÇINAR KASIM 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
101	DAR ÇINAR ARALIK 2007-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
102	GÖZDE KERMAN KASIM 2007-127 978 247 52	Onaylı	1.000,00	0,00
103	GÖZDE KERMAN ARALIK 2007-127 978 247 52	Onaylı	1.500,00	0,00
107	DAR ÇINAR OCAK 2008-594 253 689 12	Onaylı	500,00	0,00
109	GÖZDE KERMAN OCAK 2008-127 978 247 52	Onaylı	1.500,00	0,00

830.06. SERMAYE G DERLER			9.590,40	0,00
830.06.1. MAMUL MAL ALIMLARI			9.590,40	0,00
830.06.1.2. Büro ve yeri Makine Teçhizat Alımları			9.590,40	0,00
830.06.1.2.90. Di er Makine Teçhizat Alımları			9.590,40	0,00

F NO	YEV M YE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
77		TEKSERV S LTD. T .-SIVI AZOT TAKIMI ALIMI	Onaylı	6.900,00	0,00

YARDIMCI DEFTER

Kurulu Adı : Kemik ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Ya Dokusundan Farklılandırılmış Hücre ve Seramik/Polimer Kompozit çeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi
Cari Yıl : 2005
Başlangıç Hesap Kodu : 800 Başlangıç Tarihi : 01.01.2005
Bitiş Hesap Kodu : 9 Bitiş Tarihi : 24.07.2008

78		ALSER TEKNİK A.Ş.-SICAKLIK KONTROL SİSTEM ALIMI	Onaylı	2.690,40	0,00
830.07. SERMAYE TRANSFERLER				20.450,00	0,00
830.07.1. YURT Çİ SERMAYE TRANSFERLER				20.450,00	0,00
830.07.1.5. Diğer Sermaye Transferleri				20.450,00	0,00
830.07.1.5.90. Diğer				20.450,00	0,00
F NO	YEVMIYE NO	F AÇIKLAMA	DURUM	BORÇ	ALACAK
73		ODAGEM A.Ş.-AĞRI İNMA PLAK.-KAZAN BOR.ÇAL.H Z.ALIMI	Onaylı	2.839,26	0,00
122		LABORATUVAR TİPİ SICAK ZOSTATİK PRES (HIP)C HAZIR MUAYENE VE BAKIMI	Onaysız	8.563,92	0,00
121		ODAGEM A.Ş.-KAZAN BOR ÇAL.H Z.ALIMI	Onaylı	9.046,82	0,00