



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

2004-236

ZOR KAYNAYAN KEMİK KIRIKLARININ TEDAVİSİNE  
YÖNELİK KEMİK MORFOJENİK PROTEİNİ İÇEREN  
BİYOBOZUNUR POLİMERİK SALIM SİSTEMLERİ  
TASARLANMASI

PROJE NO : TBAG-2060 (101T041)

OOT  
Bil. B

Temel Bilimler Araştırma Grubu  
Basic Sciences Research Grant Committee

*2004-236*

**ZOR KAYNAYAN KEMİK KIRIKLARININ TEDAVİSİNE  
YÖNELİK KEMİK MORFOJENİK PROTEİNİ İÇEREN  
BİYOBOZUNUR POLİMERİK SALIM SİSTEMLERİ  
TASARLANMASI**

**PROJE NO : TBAG-2060 (101T041)**

*ODTÜ Biyolojik  
Bil. Böl. Ankara*

*1.1.2001*

*1.9.2003*

*(31)*

**PROF.DR. VASIF HASIRCI  
PROF.DR. FEZA KORKUSUZ  
DR. DİLEK KESKİN  
DR. AYŞEN TEZCANER**

*1-44*

**ARALIK2003  
ANKARA**

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada kemik kırıkları ve iyileşmesi güç kemik defektlerinin tedavisinde kullanılmak üzere çift etkili, iki ayrı yapıdan oluşan bir sistem tasarlanmıştır. Kırık bölgесine hücresel bir ürün olan KMP'yi kontrollü olarak salan bir hidrojel sistemi ile dolgu yaparak dokudaki boşluğun doldurulması ve bu bölgenin kemiğin bütünlüğünü destekleyecek (bir sargı maddesi işlevini görecek) bir polimerik ağaçla çevrelenmesinin kemik tedavisinin zorlaştığı durumlar için faydalı bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür. Bunun için kemik rejenerasyonun hızlandırılmasını sağlayacak, kemik morfojenik proteini içeren, bir salım sistemi ile hasarlı bölgede stabilizasyonu sağlayacak bir biyobozunur polimerik ağ yapı geliştirilmiş ve bu yapıların deneysel kemik defektlerinin iyileşmesine etkisi incelenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZ .....	8
ABSTRACT.....	9
1. GİRİŞ.....	10
2. GELİŞME.....	14
Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerinin Hazırlanması.....	16
Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerine Aktif Madde Yüklenmesi...	16
Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	16
Protein A Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin <i>In situ</i> Salım Kinetiğinin Araştırılması.....	16
Vicryl Ağ Hazırlanması ve Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	17
Kemik Morfojenik Proteini (KMP) Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin <i>In Situ</i> Salım Kinetiğinin İncelenmesi.....	18
<i>In vitro</i> Hücre Kültürü Deneyleri.....	18
Osteoblastların İzolasyonu ve Kültür Oluşturulması.....	18
KMP Yüklü Salım Sisteminin <i>In vitro</i> Karakterizasyonu.....	20
KMP Yüklü İmplantların <i>In vivo</i> Uygulamaları .....	20
a. Deney Hayvanlarının Tanımı ve Sayısı .....	20
b. Cerrahi Girişime Hazırlık.....	21
c. Cerrahi Girişim Planı.....	21
d. Araştırmadan Çıkarılma Ölçütleri.....	22
e. Ratların Öldürülmesi ve Deney Materyallerinin Alınması.....	22
f. Histolojik Değerlendirme.....	22
g. Radyolojik Değerlendirmeler .....	23
3. SONUÇLAR.....	24
Taramalı Elektron Mikroskopisi ile Yüzey İncelenmesi.....	24
Protein A yüklü Kollajen-kondroitin Sülfat Hidrojellerin <i>In Situ</i> Salım Kinetiği.....	26
Protein A Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin <i>In Situ</i> Salım Kinetiğinin Optimizasyonu.....	27

Kemik Morfojenik Proteini (KMP) Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin In Situ Salım Kinetiğinin İncelenmesi.....	29
In vitro Hücre Kültürü Deneyleri.....	31
Vicryl Ağ'ın Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	32
Bir Haftalık <i>In vivo</i> Uygulamaların Histolojik Sonuçları.....	35
Üç Haftalık <i>In vivo</i> Uygulamaların Histolojik Sonuçları.....	38
Radyolojik Sonuçlar.....	44
Değerlendirmeler.....	44
REFERANSLAR.....	45

## **TABLO LİSTESİ**

### **Tablo**

1. Kollajen-kondroitin sülfat hidrojellerinin hazırlanma koşulları .....	15
2. Vicryl (4-0 and 5-0) sutürlerin Mekanik Özelliklerindeki Değişimler <i>(in situ)</i>	34
3. Vicryl (4-0 and 5-0) Sutürler ile Örülü Ağların Mekanik Özellikleri	35
4. İmplantın doku uyumluluğunun histolojik olarak skorlanması.....	43
5. Radyolojik Bulgular	44

## ŞEKİL LİSTESİ

### Şekil

1. Protein A Kalibrasyon Eğrisi .....	17
2. Vicryl ağın genel görüntüsü.....	17
3. Kollajen hidrojelin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	24
4. Kollajen hidrojelinin dehidrotermal uygulamasından sonra üst yüzeyinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	25
5. Kollajen hidrojelinin dehidrotermal uygulamasından sonra yan yüzeyinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	25
6. Dehidrotermal uygulama ve kimyasal yöntem ile çapraz bağlanmış Kollajen hidrojelinin üst yüzeyinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	26
7. Tablo 1 ‘deki Kollajen hidrojellerinden Protein A salım profileri.....	27
8. PLLA kaplı kollajen hidrojellerinden Protein A salım profilleri.....	28
9. PLLA/SAIB (3 kez) kaplı kollajen hidrojellerinden Protein A salım profili	28
10. PLLA/SAIB (2 kez) kaplı kollajen hidrojellerinden Protein A salım profilı.....	29
11. PLLA/SAIB kaplı kollajen hidrojellerinden farklı dozlarda KMP salım profilı.....	30
12. PLLA-SAIB kaplı Kollajen kondroitin sülfat disklerinden KMP salımının <i>in vitro</i> etkisinin osteoblast hücrelerdeki ALP aktivitesiyle ölçülmesi .....	32
13. İki farklı kalınlıkta PLGA (Vicryl) iplığın (a) USP 5/0 ve (b) USP 4/0 gerilme test sonuçları .....	33
14. İki farklı kalınlıkta PLGA ipliklerle (a) USP 5/0 ve (b) USP 4/0) örülmüş ağların gerilme test sonuçları .....	34
15. Bir mikrogram KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant grubundan, birinci hafta sonunda elde edilen kesit mikrografları. ....	36

16. a, b) İki mikrogram KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat'a implant grubunun, birinci hafta sonuna ait panoramik kesit mikrograflarında defekt alanı görülmektedir. (c, d): Aynı grupta kortikal kemik komşuluğunda bağ dokusu içinde yapılananan genç kemik trabekülleri izlenmektedir. ....	37
17. Kollajen-kondroitin sülfat implant grubundan birinci haftanın sonuna ait mikrograf.....	38
18. Kontrol grubuna ait kesit mikrografında birinci haftanın sonunda, kortikal kemik .....	38
19. 1 µg KMP içeren Kollajen-Kondroitin Sülfat implant grubunda üçüncü haftanın sonunda defekt alanı izlenmektedir. (a): Panoramik görüntüde defekte komşu, polimerik ağ ile destekli, dıştaki periosteal katın, merkezde, implantın içine doğru uzandığı izleniyor. Ağ çevresindeki fibröz enkapsülasyona dikkat ediniz. (b-d): Kortikal kemik komşuluğundaki genç spongiyöz kemik dikkati çekmektedir.....	39
20. 2 µg KMP içeren Kollajen-Kondroitin Sülfat implant grubunda üçüncü haftanın sonunda (a)'da panoramik olarak, (b)'de daha büyük büyütmede defekte komşu, iyi düzenlenmiş süngerimsi kemik izleniyor. (c)'de dış kısımdaki kalınlaşmış, mitotik olarak ileri derecede aktif periost içinde genç kemik trabeküllerinin olduğu alanlar görülmektedir. ....	40
21. Kollajen-Kondroitin Sülfat implant grubundan üçüncü haftanın sonuna ait mikrograflar.....	41
22. Kontrol grubuna ait kesit mikrografında üçüncü haftanın sonunda, kortikal kemik (C) komşuluğunda ileri derecede selüler kalınlaşmış periost (*) izlenmektedir. ....	42

## ÖZ

Kemik morfojenetik proteinler (KMP) kemik oluşumunu uyarıcı özellikleri nedeniyle çeşitli kemik hastalıkları üzerinde klinik araştırmaları yoğun bir şekilde sürdürmekte olan proteinlerdir. Kemik oluşumundaki güçlü etkileri nedeniyle tedavide lokal olarak sadece hasarlı kemik bölgesine uygulanmaları gerekmektedir. Bu amaçla son yıllarda KMP içeren değişik birçok polimer ilaç salım sistemi araştırılmıştır. Bu klinik ihtiyacı düşünerek KMP yüklü disk şeklinde çözülebilir Kollajen ve kondroitin sülfat içeren taşıyıcı bir sistem tasarlanmıştır. *In situ* salım deneyleri model olarak seçilen bir protein (floresan işaretli protein A) ile yapılmış ve bunların sonucunda çok yüksek salım hızı (hemen hemen bütün malzemenin 24 saatte salındığı) gözlenmiştir. Çözünebilir kollajenin yüksek su bağlanması kapasitesiyle açıklanabilen bu problem sistemin poli(L-laktit), (PLLA) ve sükroz asetat izobutirat (SAIB) polimerlerinin karışımıyla kaplanması ile çözülmüştür. Böylece model ilaç için salım süresi 12 güne uzatılmıştır. Aynı sistemin KMP ile yapılan *in situ* salım deneyleri KMP ye özel ELISA kitleri ile yapılmış ve model ilaçtan daha yavaş salım ele edilmiştir. KMP salımları ilaçın yarısının 15 günde salındığını göstermiştir. Osteoblast hücreleri ile yapılan *in vitro* deneylerde  $2 \mu\text{g}$  KMP içeren impantların ALP enzim aktivitesinde anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

KMP salım sistemini *in vivo* uygulamalar sırasında kemikte hasarlı bölgede sabit tutabilmek ve aynı zamanda kemiğe de destek sağlamak amacıyla, Vicryl ameliyat ipliklerinin örülüp, daha sonra poli(L-laktit-ko-glikolit) (PLGA) ile fiber bağlanma yöntemi ile bağlanması ile bir ağ yapı hazırlanmıştır. Bu ağ yapı ile Kemikteki iyileşme düzeyi iki zaman süreci (1 hafta ve 3 hafta) için değerlendirilmiştir. KMP taşıyıcı sistemin kemik oluşumunu indükleyici (osteoinductive) etkisi histolojik skorlama, x-rayları (röntgen analizleri) ile değerlendirilmiştir. *In vitro* deneyler KMP yüklü PLLA-SAIB kaplanmış kollajen, kondroitin sülfat disklerinin iyi biyoyumluluk ve optimum osteojenik uyarıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Histoloji mikrograflarındaki 1 hafta sonundaki yapısal değişiklikler doza bağlı periostta kemikleşme göstermektedir. 3 hafta sonundaki histolojik bulgularda ise her iki dozda da (1 ve  $2 \mu\text{g}$ ) sonuçlar yaklaşık aynıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik Morfojenik Proteini, Kollajen, kondroitin sülfat, polimerik ağ, kontrollü ilaç salımı, PLLA, SAIB

## ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are osteoinductive proteins which are under intense clinical investigation for use in various bone related treatments. Owing to their high potential for new bone formation they require local application at the treatment site. For this purpose various polymeric delivery systems involving BMPs have been prepared in recent years. Focusing on this clinical need a disc shaped BMP carrier was designed using soluble collagen and chondroitin sulfate. *In situ* release studies were carried out with a model protein (FITC labeled Protein A) indicated a very high rate of release; system released most of its protein content within 24 h. This was expected from the high water binding property of the soluble collagen and the rate could be decreased by providing a poly(L-lactide), (PLLA) and sucrose acetate isobutyrate (SAIB) based coat around the release system following BMP loading. It was thus possible to extend the release period to about 12 days for the model drug. *In situ* release of BMP from the same carriers as quantitated by an ELISA kit indicated an even slower kinetics with 50 % of the protein released in 15 days. *In vitro* studies involving osteoblasts and 2  $\mu\text{g}$  rhBMP loaded implants revealed a significant difference in the ALP activities.

In order to be able to keep the BMP delivery system at the bone defect site and also to provide support and test the osteoconductive effect, a mesh knitted with Vicryl sutures and bonded with poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) was used in the *in vivo* applications. Two time periods, 1 and 3 weeks, were used to evaluate the healing process. Osteoinduction by the BMP carrier system was assessed by histology based bone scoring and X-ray examinations. PLLA/SAIB coated collagen discs containing BMP presented good biocompatibility and optimum osteogenic stimulation. Structural changes in histological micrographs at week 1 indicated dose-dependent periosteal ossification. At the end of week 3 histological findings with both BMP (1' and 2  $\mu\text{g}$ ) doses were almost the same.

**Keywords:** Bone Morphogenetic Protein, collagen, chondroitin sulphate, polymeric mesh, controlled drug delivery, PLLA, SAIB

## GİRİŞ

Kemik kırıkları, menapoza bağlı kemik erimesi (osteoporoz), kanser veya kemoterapi gibi başka bazı etkenlere bağlı olarak oluşabilmektedir. Kemik, % 30 oranında hücreler ve organik matriks ile %70 minerallerden oluşur. Kemik kırığının iyileşmesi, birbiriyle ilgili üç fazdan oluşur: enflamasyon, onarım ve yeniden şekillenme. Bir çok büyümeye faktörü ve düzenleyici proteinler bu olayda görevlidirler. Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) adlı büyümeye faktörü kemik iyileşmesinde etkili en önemli regülatörlerden biridir (Remedios, 1999). Osteoporoz genellikle kemik kırıkları oluşuncaya kadar kendini belli etmeyen sinsi bir hastaliktır. Yüksek morbidite ve mortalite sebebi olması nedeniyle klinikte önemli bir hastalık olarak görülür. Kemik yoğunluğu ölçülmesi risk altındaki kişilerin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Taxel, 1998). Bu tür durumlarda kırık riskinin artmasının yanı sıra tedavinin güçleşmesi de klinikte yaşanan problemlerden biridir. Kemik bozukluklarında terapötik yaklaşım internal tesbitle birlikte genellikle yeni kemik oluşumunu sağlayacak malzemelerin implantasyonudur. Son yıllarda kemik morfojenik proteinin (KMP) kaynamayan kemik kırıklarında ve kemik bozukluklarında tedavi amaçlı olarak kullanılması umut verici sonuçlar vermiştir. Ayrıca, KMP içeren implantların kullanımını kemik transplantasyonlarından doğacak hastalık taşıma riskini ve ölüm oranlarını azaltması beklenir (Wolfe, 1999 ve Pieper, 1999). Kullanılan taşıyıcı sistemlerin amacı bir osteojenik regülatör molekül olan KMP'nin implant bölgесine güvenli ve etkili bir şekilde sunulmasıdır. Hazırlanan taşıyıcı matrikslere kemik kompozisyonunda bulunan ve ostejenik aktivitesi bilinen kondroitin sülfat veya hyaluronik asit eklenderek kemik iyileşmesi hızlandırılmaya çalışılmıştır (Pieper, 1999, Solchaga, 2000).

Kemikte kırık olduğunda, kemiğin biçimini ve işlevini geri kazanması için bir dizi dinamik olay başlar. Bu olayda görevli moleküllerden biri olan KMP rekombinant olarak da üretilmektedir ve klinikte önemli bir yer tutar (Holinger, 1996). Kırılan bir kemikte kallus oluşumunun derecesi kırığın fiksasyonuna bağlıdır. Burada mekanik uyarıyı biyolojik cevaba dönüştüren mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Literatürde bunu açıklayan bir model 'mekanobiyolojik transdüksiyon' olarak tanımlanır. Kemiğin bütünlüğü bozulduğunda bir seri biyokimyasal ve hücresel olay inflamasyon reaksiyonlarını başlatır. Bazı mesajcı moleküller (pihtlaşma ve komplement sistem elemanları, büyümeye faktörleri gibi) salınır ve aktive edilir. Bunlar anjiojenez (yeni damar oluşumu) ve bağ doku oluşumundaki hücrelerin göç, çoğalma ve protein sentezlerini kontrol eder. Mekanik olarak nötr olan alanlarda kırık bölgesi

yeniden damarlanır ve buraya gelen osteoblastlar bölünerek yeni kemik dokusunu oluştururlar. Mekanik olarak kararsız kırık bölgelerinde ise kılcallar bozulur. Bu yüzden bu alanlarda ortam tekrar hipotoksik olur. Bu ise kıkırdak oluşumu ile kırığı sağlamlaştıran kondrositlerin değişimini destekler. Eğer onarım dokusunun gücü engellenirse doku tekrar inflamasyon mekanizmasını başlatır ve daha fazla hücre göç ederek çoğalır. Bunlardaki protein sentezi onarım kallusunu arttırr. Kallus oluşumu doku hareketinin gerektirdiği dirence ulaşınca durur (Probst, 1997).

Günümüzde ortopedik uygulamalar, operatörlerin kesme, delme, kazıyarak genişletme ve kemiği yerine oturtma becerilerine dayanmaktadır. Kemik kırıklarının fiksasyonu iki parçanın vidalanması, plaka ya da tellerle tutturulması ve kemik ile plastik (ya da metal) malzemelerin birleştirilmesinin sağlanması gibi yollarla yapılmaktadır. Bu işlemlerin çoğundaki başarı doktorun yeteneği ve implant tasarımının başarısı gibi gösterilse de gerçekte sonuç, kemiğin kendi hasar onarım özelliklerinin bir ürünüdür. Bunu göz önünde bulundurmamak en etkin ortopedik yöntemi bile başarısız kılabılır. Aksine kemikte iyileşme potansiyelinin kullanılması ve buna göre tedavi yapılması da en komplike duruma bile çözüm bulunabilmesini sağlayabilir. Kemiğin gerilme kuvveti hemen hemen kalıplanmış çelik kadar olmakla birlikte 3 kat daha hafif ve 10 kat daha esnektir. Kemik yapısı sabit gibi görünmekle birlikte mekanik ve hormonal sinyaller doğrultusunda sürekli bir değişim halindedir (Buckwalter, 1999).

Biyobozunur malzemelerin ortopedik alanda kullanılması son yıllarda hızla armaktadır. Bu malzemelerin uygulama alanları, kırık fiksasyonu, kıkırdak onarımı, menisküs tedavisi, kemik yenileme, kiriş tedavisi ve ilaç salım sistemleridir. Bunlardan özellikle kırık tedavisi, ligament tedavisi ve ilaç salım sistemleri olumlu sonuçlar vermektedir (Yuehuei, 2000). Biyobozunur internal fiksasyon malzemeleri silindirik çubuklar, tıkaçlar, oklar, teller şeklinde kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, poliglikolit iğneler çocuklardaki kırıklarda kullanılmaktadır. Bunlarla ilgili komplikasyonlar, yara enfeksiyonu (% 4) ve fiksasyon başarısızlığıdır (% 4). Ayrıca poliglikolid implantlarda % 2 oranında ameliyat sonrası yabancı madde reaksiyonları görülmekle birlikte bu polilaktidlerde görülmemiştir (Bostman, 2000). Ameliyat sonrası bu malzemelerin geri çıkarılma gerekliliği olmaması ise ekonomik, psikolojik ve yaranın iyileşme hızı açılardan avantajlıdır (Rokkanen, 2000). Biyobozunur polimerik kemik kırığı fiksasyon malzemeleri fiziksel özellikleriyle sert dokulara metallerden daha uygundur. Bunların metalik implantlara göre daha çok tercih edilmesinin başka bir sebebi de vücutta tamamen bozunmaları ve tedavi sonrasında tekrar ağrılı ve enfeksiyon riskli bir

operasyon gerektirmemeleridir. Bu yüzden biyobozunur malzemelerle kırık tedavisi için vida, plaka vb kullanımını son zamanlarda artmıştır. Tek dezavantajı yük taşıması gerektiren uygulamalarda yeterli mekanik özellikleri olmamasıdır. Bu yönden zayıflıkları polimerlerin az kristalinite, geniş molekül ağırlığı dağılımı, zincirler arası bağların eksikliği dolayısıyla büyük boşluk oranı (metal ve seramiklere göre düşük yoğunluklu olmaları) ve kırılgan olmalarına dayanır. Bu sorunun giderilmesi için PLGA/PPF'in EGDMA ile çapraz bağlanmış ve böylece implantın boyutlarının değişmemesi ve erozyon, katlanma gibi deformasyonların en az üç haftalığına engellenmesi sağlanmıştır (Hasircı, 2000). Kemik kırıklarında fiksasyon için diğer bir uygulama da enjekte edilebilen kalsiyum fosfat kemik mineral çimentosu hazırlanıp bununla kırık bölgesinin sertlik ve gücünün artırılması sağlanmıştır (Stankewich, 1996). Kemikte kontrollü ilaç salım sistemleri uygun taşıyıcı ve üç boyutlu destek maddesi azlığı nedeniyle sınırlıdır. Bu sorunu çözmek için mikromimarisi istenilen şekilde hazırlanabilecek biyobozunur bir sistem liyofilizasyon yöntemiyle yapılmış ve bunun kemik rejenerasyonunu sağlayacak makromolekülleri salım özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada ortalama gözenek boyutu ve KMP yüklenmesinin salım kinetiğine etkisi incelenmiştir. Başlangıçta çok hızlı, sonra yavaşlayan uzun süreli salım sağlanmış ve proteinin aktivitesi sıçanlarda ektopik kemik induksiyon testiyle kemik rejenerasyonu yönünden değerlendirilmiştir (Whang, 2000). Gogolewski ve ark. (2000) tarafından polimerin kimyasının kemik iyileşmesinde rolü olup olmadığı bölgesel kemik hasarlarının biyobozunur polimerik membranlarla rejenerasyonu çalışılarak incelenmiştir. Sonuçta poli(L/D-laktid) membranların yeni kemik oluşumu ve gelişimini sağladığı bulunmuştur.

Kemik Morfojenik Proteinin uygulamadaki başarısı daha çok hedef bölgeye ulaşılmasını sağlayan taşıyıcı sisteme bağlıdır. KMP salım sistemleri son zamanlarda sert doku tasarımindan da büyük önem kazanmıştır (Saito, 2003, Lu, 2003). KMP salım sisteminin taşıması gereken bazı önemli kriterler bulunmaktadır. Bunlar biyoyumluluk, kolay uygulanabilirlik, sterilize edilebilme ve yeni kemik oluşumuna uygun kalıbı (scaffold) oluşturmadır (Saito ve Takaoka, 2003).

Halen lokal kemik rejenerasyondaki uyarıcı etkisi ile ilgili klinik denemeleri sürmekte olan iki protein (rekombinant insan kemik morfojenik proteinleri 2 (rhBMP-2) and 7 (rhBMP-7)) için emilebilir kollajen sünger ile demineralize kemik matriks yapıları (Helistat®, Infuse™) hazırlanmış ve denenmiştir (Boyne, 1997, Howell, 1997, INFUSE™ BONE GRAFT web sayfası, Cook ve ark, 1995).

### **Projenin önerilen formuyla karşılaştırılması ve yapılan değişiklikler:**

Kollajen-kondroitin sülfat hidrojellerinin hazırlanmasında biyoyumluluk, biyobozunurluk ve kemiğin doğal yapısında bulunma gibi önemli sebeplerle salım sisteminin ana taşıyıcısı olarak seçilen kollajenle model protein (protein A) kullanılarak yapılan ön deneylerde kollajenin protein olması ve bu sistemin sulu ortamda uzun süre dayanıklılığını koruyamaması nedeniyle yapıyı kuvvetlendirecek ve destekleyecek başka bir biyolojik malzeme olan kondroitin sülfat ile beraber kullanılarak diskler hazırlanması gerekliliği görülmüştür. Bu da projedeki başlangıçtaki madde seçiminin doğruluğunu göstermektedir. Ancak bu iki biyolojik malzeme ile sonuçta oluşan hidrofilik yapının proteini beklenenden daha hızlı salması nedeniyle yapı PLLA ve SAIB polimerlerinin karışımı ile kaplanarak modifiye edilmiştir.

Biyobozunur PLGA ipliklerinin örgülü bir ağ yapısına (knitted mesh) dönüştürülmesi projede önerildiği gibi yapılmıştır. İki farklı kalınlıkta (4/0 ve 5/0) PLGA ipliği ile yapılan bu ağlardan 4/0 ile hazırlananların daha kalın olması nedeniyle daha dayanıklı ve kuvvetli olduğunu göstermiştir. Ancak *in vivo* uygulamada sıçan femur kemiği etrafına 5/0 iplik kullanılarak hazırlanan ağların daha uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca bu ağlarında başlangıçtaki iyileşme dönemi için yeterli mekanik özellikle olduğu mekanik testlerle belirlenmiş ve bu yüzden *in vivo* uygulamalarda bunlar kullanılmıştır. Mekanik testler ip kalınlığı ile ağıın mekanik özellikleri arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu kanıtlamıştır. Böylece projenin ileriye yönelik, klinik deneylerde uygulamaya açık bir yapı da olduğu bulunmuştur.

Deney hayvanlarında (sıçan) oluşturulması hedeflenen kırık modelinin bu hayvanlara alçı vb. destek kullanılamaması, hayvanların kırık bacakla beslenme sorunu yaşaması ve kemiklerin küçük boyutta olması nedeniyle kırığın bütün deneklerde optimum boyuta getirilmesinin zorluğu nedenleriyle tedavisi güç başka bir kemik problemi olan defekt modeli seçilmiş ve kemiklerde standart boyutta hasar oluşturulmuştur. Defektlerin bu iki polimerli çift etkili sistemin uygulanması ile iyileşme süreci ve düzeyi 1 hafta ve 3 hafta süreyle izlenip değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın ülkemizde de çok yaygın bir konu olan kemik tedavisine farklı bir boyut getireceği ve malzemelerin ortopedideki kullanımı açısından faydalı olacağı düşünülmektedir. Günümüzde polimerlerin kemik kırıklarındaki tedavisi genellikle vida vb malzemeler ya da sargılar şeklindeki. Kırıkları iyileştirmeyi hedefleyen bu

çalışmada hem protein salımı yapan hem de kemiği dışardan destekleyen bir sistemin birlikte olması yeni bir yaklaşımdır.

## GELİŞME

### Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerinin Hazırlanması

İmplantların hazırlanmasında kullanılan kollajen rat kuyruklarından izolasyon ve saflaştırılmayla elde edilmiştir (Franke, 2000). Bu yöntemde öncelikle rat kuyrukları % 70 etanolde bekletilmiş ve derileri çıkarıldıktan sonra tendon fiberleri ayrılmıştır. Bu tendonlar % 0.1 asetik asit içinde (100 ml/g tendon) 48 saat 4° C de çözülmüş ve daha sonra 10,000 dev/dk 30 dk santrifüj edilerek saflaştırılmıştır. Kollajen-kondroitin sülfat hidrojelleri hazırlanmadan önce, dokudan elde edilen kollajen 48 saat liyofilize edilmiş ve kuru ağırlığı ölçülmüş diskler hazırlanmıştır.

Kollajen-kondroitin sülfat hidrojelleri daha önce belirtildiği gibi kollajenin (6%) kondroitin sulfatla (0.6%) karıştırılıp % 0.1'lik asetik asit içerisinde çözülmesi ve -40 °C de bir gece donduruluktan sonra 16 saat liyofilize edilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan hidrojeller önce dehidrotermal daha sonra da kimyasal yöntemle çapraz bağlanmıştır. Hidrojellerin hazırlanış yöntemlerindeki ve kompozisyonlarındaki farklılıklar Tablo 1 'de verilmiştir.

Kurutulan hidrojellerden 3 mm çapında diskler kesilmiş ve kullanılıncaya kadar desikatörde saklanmıştır. Kollajen-KS diskleri kimyasal olarak 28 mM karbodiimid ve 10 mM N-hidroksisüksinimid (NHS) ile 2 saat 37 °C de sallamalı su banyosunda inkübe edilerek çapraz bağlanmıştır. Daha sonra diskler 1 saat 0.1 M fosfat tamponunda bekletilip 4 kez damıtık su ile yıkanarak çapraz bağlayıcılar uzaklaştırılmıştır.

Tablo 1. Kollajen-Kondroitin sülfat hidrojellerinin hazırlanma koşulları

Örnek	Kollajen Konsantrasyonu (%,w/v)	Dehidrotermal Koşullar	Kondroitin Sülfat Miktarı , Ekleme aşaması	Kimyasal Çapraz Bağlama Koşulları *
A	1	2 saat oda sıcaklığı, 48 saat, 80 °C	-	-
B	1	2 saat oda sıcaklığı, 48 saat, 80 °C	50 mg, 2 saat emdirme yöntemi ile kimyasal çapraz bağlama aşamasında	Kondroitin sülfat ile 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon
C	2	2 saat oda sıcaklığı, 24 saat, 50 °C	25 mg, 2 saat emdirme yöntemi ile kimyasal çapraz bağlama aşamasında	2 saat oda sıcaklığında inkübasyon
D	2	2 saat oda sıcaklığı, 24 saat, 50 °C	50 mg, hidrojel yapım aşamasında	2 saat oda sıcaklığında inkübasyon
E	2	2 saat oda sıcaklığı, 24 saat, 50 °C	100 mg, hidrojel yapım aşamasında	2 saat oda sıcaklığında inkübasyon
F	2	2 saat oda sıcaklığı, 24 saat, 50 °C	100 mg, hidrojel yapım aşamasında	2 saat oda sıcaklığında kondroitin sülfat ile inkübasyon

\*Çapraz bağlama için karbodiimid (14 mM) ve N-hidroksisüksinamid (5.5 mM) kullanılmıştır.

### **Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerine Aktif Madde Yüklenmesi:**

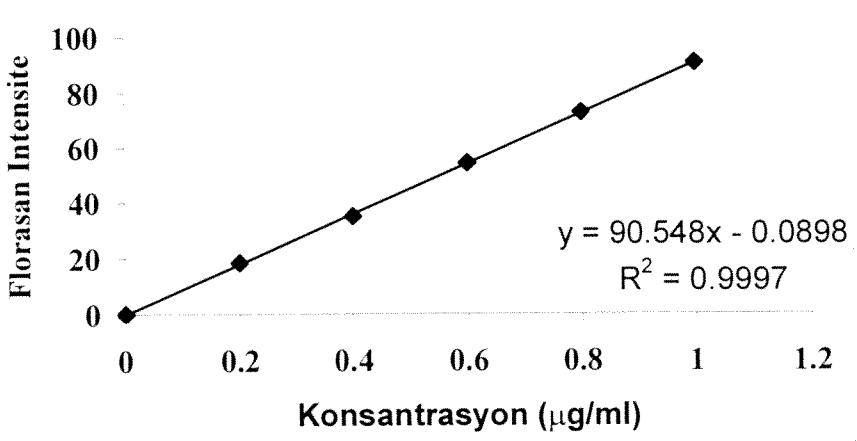
Kemik tedavisine yönelik bu projede aktif madde olarak seçilmiş olan “kemik morfojenik proteinin” hem rekombinant hem de doğal yolla elde edilmiş ticari formları bulunmaktadır. Ancak bu malzemenin maliyetinin çok yüksek olması ve *in situ* ilaç salım deneylerinde ilacın biyolojik aktivitesinden çok fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirleyici olması nedeniyle ön araştırmalarda molekül ağırlığı KMP’ye çok yakın olan ve yine protein yapısında olan “Protein A” model olarak kullanılmıştır. Yükleme deneylerine başlamadan önce Protein A’nın *in situ* tayin yöntemi, kalibrasyon eğrileri ve ölçülebilirlik sınırları spektroflorimetre ( $\lambda_{Ex}$ : 494.4 nm,  $\lambda_{Em}$ : 516.8 nm) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 1). Disk şeklinde kesilen hidrojellere 2 µg Protein A (10 µl su içerisinde) vakum yapılip boşaltılması yöntemiyle emdirilmiş ve daha sonra 24 saat vakum altında kurutulmuştur.

### **Taramalı Elektron Mikroskopisi**

Kollajen-kondroitin sülfat diskleri kimyasal ve dehidrotermal çapraz bağlamalardan önce ve sonra altın kaplama yapılarak taramalı elektron mikroskopisinde (JEOL (Model JSM 6400, Japan) incelemiştir. Kemik ve implant içeren örneklerde farklı zamanlarda çıkarılarak % 10 fosfat tamponlu formalin (pH 7.0) içerisinde, oda sıcaklığında saklanmış ve altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskopisiyle incelenmiştir.

### **Protein A Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin *In Situ* Salım Kinetiğinin Araştırılması**

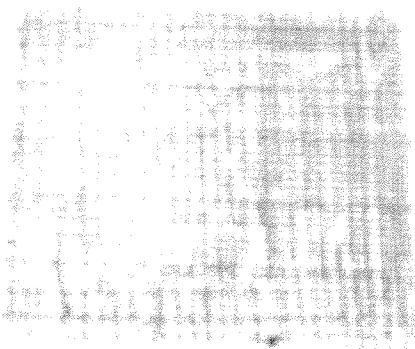
Disklerin *in situ* salım deneyleri kapaklı tüplerde 3 mL ‘de fosfat tampon çözeltisi (0.1 M, pH 7.4) içinde 37 °C’de yapıldı. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından alınan örneklerdeki Protein A miktarı spektroflorimetre ile tayin edildi. Her ölçümde tüm salım ortamı tazelendi. Bu çalışmalar sonucunda Protein A salımının bütün örneklerde çok hızlı olduğu ve kimyasal yöntemle çapraz bağlama aşamasında kondroitin sülfat eklenen hidrojellerin 2 gün içerisinde şeklini ve bütünlüğünü kaybettiği görüldü. Hidrojellerin daha uzun süre şeklini koruyabilmesi için bundan sonraki çalışmalarada kondroitin sülfatın başlangıç aşamasında kullanıldığı (Tablo 1’deki D, E, F) tiplerinde örnek hazırlanmasına karar verildi.



Şekil 1. Protein A Kalibrasyon Eğrisi

#### Vicryl Ağ Hazırlanması ve Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi:

Vicryl ağ, PLGA (vicryl) ameliyat ipliklerinin (Ca-stearat kaplı)  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  gözenekler oluşturacak şekilde özel bir kasnakda dokunması ile hazırlandı. Daha sonra bu yapı, üzerine seyreltik PLGA (50:50) (0.6 %, kloroform) çözeltisi dökülp kurutularak sabitlendi (Şekil 2). İki farklı kalınlıkta PLGA ipliği kullanılarak hazırlanan ağların mekanik özellikleri dikdörtgen şeklinde kesilen ( $1 \times 10 \text{ cm}$ ) örnekler projeden makine teçhizat yardımı ile alınan mekanik test cihazı (MT-LQ, Surrey, U.K) ile uygulanan gerilme mukavemeti testleriyle ölçüldü. Ayrıca iki farklı kalınlıkta PLGA iplığının ( $1 \times 8 \text{ cm}$ ) (USP 4/0 ve 5/0)  $37^\circ\text{C}$ 'de fosfat tamponunda degradasyon öncesi ve sonrasında (10 mM, pH 7.4) mekanik özellikleri incelendi.



Şekil 2. Vicryl ağın genel görüntüsü

## **Kemik Morfojenik Proteini (KMP) Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin *in situ* Salım Kinetiğinin İncelenmesi**

Protein A ile yapılan ön deneyler sonucunda Protein A salımının bütün örneklerde çok hızlı olduğu gözlendi. Salımın yavaşlatılması amacıyla hazırlanan kollajen hidrojelleri (% 6 kollajen + 0.6 % kondroitin sülfat) üzerine her ikisi de % 10'luk poli(L-laktik asit), (PLLA) ve SAIB (1:1) polimer çözeltisi ile kaplama yapıldı. Kaplama 5 mL polimer çözeltisi içerisinde disklerin batırılıp 5 saniye tutulduktan sonra çıkarılması ve çözücünün (kloroform) uzaklaştırılması (hava ile kurutma) ile yapıldı. Kuruyan örneklerde aynı işlem tekrarlanarak 2. ve 3. kaplamalar yapıldı.

Protein A ile tekrar yapılan deneyler sonucunda PLLA-SAIB (2 kez) kaplı Kollajen-kondroitin Sülfat hidrojellerinin (sırasıyla 6 % ve 0.6 %) salım profilinin istenildiği gibi olduğuna karar verildi. Bu sistemle *in vivo* da planlanan iki farklı dozda KMP yüklü, 1 µg ve 2 µg içeren dörder sistem hazırlandı ve salım deneyleri yapıldı. Her ölçüm zamanında salım ortamı tümüyle yenilendi. Salınan KMP'nin miktarının tayin edilebilmesi için bu proteine özel 96 kuyucuklu ELISA kit (QUANTIKITINE® Colorimetric Sandwich ELISA, R&D Systems, U.K) kullanılarak immunoassay yapıldı (Şema 1). Sonuçlar Kinetic Mikroplate Reader ile 450 nm'deki U.V absorbansının düzeltme dalga boyu olan 570 nm dekiyle farkının alınması ve standart örneklerle çizilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı.

### ***In vitro* Hücre Kültürü Deneyleri**

#### **Osteoblastların İzolasyonu ve Kültür Oluşturulması**

Genç-erkek Sprague-Dawley ratlarından stromal osteoblastik hücreler izole edildi (Köse, 2003). Bu işlemde ratlar dietileter koklatılarak termine edildi ve steril koşullarda femur kemikleri çıkarıldı. Yumuşak dokunun temizlenmesinden sonra metafizyal uçlar kesilerek kemik iliği kemiğin içine primer ortam (DMEM % 20 FCS, 100 ünite/mL penisilin ve 100 ünite/mL streptomisin) eklenderek alındı. Aspire edilen kemik iliği santrifuj edilerek (400 g, 10 dakika) pelet kısmında çöken hücreler tekrar primer ortamda çözülerek alındı. Bu hücreler 37°C de, % 95 nemde ve CO<sub>2</sub> inkübatoru içerisinde kültür edildi. (Sanyo, Japan, Model MCO 175). İlk pasajdan sonra osteoblastik başkalaşımı sağlamak için komplete besi ortamı (DMEM, % 20 FCS, 10 mM β-gliseroftosfat, 50 µg/mL L-askorbik asit, 10 nM deksametason, 100 ünite/mL penisilin ve 100 ünite/mL streptomisin) eklendi. Bu ortam her 48 saatte bir yenilendi.

## **Şema 1. QUANTIKITINE ile KMP Tayin Yöntemi**

Standart örneklerin ve test örneklerinin daha kalibrasyon alanı içine girecek konsantrasyonlarda hazırlanması



Assay seyrelticisinden her bir kuyucuğa 100 µl eklenmesi



Standartlardan veya test örneklerinden 50 µl eklenmesi  
(2 saat yörungesel karıştırıcıda, oda sıcaklığında inkübasyon)



Aspire edilip 4 kez yıkama



200 µl Konjugat eklenmesi

(2 saat yörungesel karıştırıcıda oda sıcaklığında inkübasyon)



Aspire edilip 4 kez yıkama



200 µl Sübstrat çözeltisi eklenmesi

(30 dakika masa üstü- inkübasyon)



50 µl Durdurucu çözelti eklenmesi



450 nm deki UV absorbansı ölçüleerek 570 nm deki düzeltmesi ile hesaplanması

## **KMP Yüklü Salım Sisteminin *In vitro* Karakterizasyonu**

*In vitro* deneylerde ikinci pasaj osteoblast hücreleri kullanıldı.  $5.10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> ekilerek 24 kuyucuklu platelerde 2 saat inkübasyonla hücre tutunması sağlandı. UV ile sterilize edilen KMP salım sistemleri (1 ve 2  $\mu\text{g}/\text{implant}$ ) kuyucuklara eklendi. Osteoblast hücreler iki farklı zaman diliminde (4 ve 7 gün süre ile) KMP salım sisteminin bulunduğu kuyucuklarda CO<sub>2</sub> inkübatör içerisinde bekletildi. Her 48 saatte bir besi ortamı değiştirildi. KMP içermeyen salım sistemi, serbest KMP eklenen (1  $\mu\text{g}$ ) ve hiçbirşey eklenmeyen kuyuculkardaki osteoblast hücreleri kontrol grupları olarak kullanıldı. 4. ve 7. günün sonunda hücreler alkin fosfataz enzimi (ALP) aktivitesinin tayini için toplandı.

Hücreler fosfat tampon çözeltisi (0.1 M, pH 7.4) ile yıkandıktan sonra 3 kez dondurulup-eritildi. Bu işlemden sonra hücreler toplanarak 1 mL Tris tampon (1 M, pH 8.0) içerisinde homojenize edildi ve 6 dakika buz üzerinde sonike edildi. Elde edilen çözeltiden 20  $\mu\text{L}$  alınarak 1 mL p-nitrofenil fosfat çözeltisine (16 mM) eklendi (Diagnostic Kit 245, Sigma) ve 30°C de tutuldu. Alkin fosfataz enzimi varlığında p-nitrofenol üretimi spektrofotometrik olarak 405 nm de 2 dakika süreyle ölçüldü. 405 nm deki absorbansın zamana karşı eğimi enzim aktivitesi hesaplanmasında kullanıldı. Her örnekteki protein konsantrasyonu Lowry yöntemi ile belirlendi. ALP nin spesifik aktivitesi kullanılarak farklı malzemelerle inkübe edilen osteoblast hücre kültürleri karşılaştırıldı.

## **KMP Yüklü İmplantların *In Vivo* Uygulamaları**

### **a. Deney Hayvanlarının Tanımı ve Sayısı**

*In vivo* deneyler ağırlıkları 250±50 g (200 g – 300 g) olan Sprague-Dawley ratlarında gerçekleştirılmıştır. Ratlar Hacettepe Üniversitesi Farmakoloji Bölümünden sağlanmıştır. Deneylerde 24 sağlıklı, erişkin erkek rat kullanılmıştır. Aklimatizasyon amacıyla ratlar alındıktan sonra 2 hafta süresince cerrahi gerçekleştirilmemiştir. Ratların bakımı Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü Deney Hayvanları Ünitesinde sağlanmıştır. Tüm işlemlerde Türk Veteriner Hekimliği Medikal Deontoloji Kanunu (6343/2; 6.7.26) ve hayvan haklarını içeren Helsinki Deklarasyonuna bağlı kalınmıştır (Bennett, 1994)

Ratlar implantlardaki KMP içeriğine göre iki gruba ayrılmış ( $1 \mu\text{g}$  ve  $2 \mu\text{g}/\text{implant}$ ). 12 rat (her gruptan 6 rat) 1.hafta sonunda termine edilmiştir. Diğer yarısı ise 3. hafta sonunda termine edilmiştir. Kontrol grupları negatif kontrol için 2 operasyon geçirmiştirlerdir: sol bacakta implant içermeyen kemik defekti, sağ bacakta KMP içermeyen, boş, implant uygulanmış kemik defekti.

### **b. Cerrahi Girişime Hazırlık**

Anestezi amacıyla kas içine ketamin hidroklorür (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (10 mg/kg) kullanılmıştır. Anestezi sonrasında cerrahi işlem gerçekleştirilecek arka bacaklar tıraş edilerek Povidon-İyot çözeltisiyle temizlenmiştir. Cerrahi sırasında ağrıyi en aza indirgeyebilmek için insizyon (kesi) yerine ve periosta jetokain enjekte edilmiştir.

### **c. Cerrahi Girişim Planı**

Ratların her iki arka bacağında femur ortasına aynı giriş uygulanmıştır. Femur üzerinden uzunlamasına cilt insizyonunu takiben, cilt altı ve kaslar geçildikten sonra, femur lateraline ulaşılmıştır. Femur 1/3 orta bölgesinde 3.2 mm'lik dental uç kullanılarak tek kortekste intramedüler bölgeye ulaşmayan ve korteksin dış yüzeyle sınırlı kısmi defekt oluşturulmuştur. Defekt bölgesinde her bir grup için sırasıyla: (a)  $2 \mu\text{g}$  KMP içeren, (b)  $1 \mu\text{g}$  KMP içeren, (c) hiç KMP içermeyen kollajen-kondroitin sülfat implant (sağ femur) grupları ve sadece defekt oluşturulup bırakılan (sol femur) kontrol grupları oluşturulmuştur. İlk iki grupta ve implantlı kontrol femurda bu proje için ürettiğimiz implantların üzeri ve femur çepeçevre poliglikolik ağa sarılmıştır. Ardından cilt altı ve cilt dokuları anatomic olarak kapatılmıştır. Ameliyat işlemleri kontrol ratların her iki femurunda birden gerçekleştirilmiştir. Enfeksiyon oluşumunu önleyebilmek üzere ameliyat sırasında kas içine 25 mg/kg sefazolin uygulanmıştır. Ameliyat sonrası ağrıyi ve iltihap riskini azaltmak için i.m. olarak Flexo (15 mg/kg) ve Sephazol (25 mg/kg) enjekte edilmiştir.

Ameliyat sonrasında ağrıyi azaltabilmek için kas içine 0.035 mg/kg etofenamat uygulanmıştır. Ameliyat yerinin kapatılması sonrasında enfeksiyonu önlemek için yara yerinin üzeri Opsite® sprey-filmle örtülmüştür. Ameliyat sonrasında ratların serbest hareketine izin verilmiştir. Ratlar yeterli su ve yemle beslenmiştir.

#### **d. Araştırmadan Çıkarılma Ölçütleri**

Cerrahi sonrasında femurlarında kırık veya enfeksiyon gelişen ratlar deneyden çıkarılmıştır.

#### **e. Ratların Öldürülmesi ve Deney Materyallerinin Alınması**

Operasyon sonrası 1 ve 3. haftalarında takipler sonlandırılmıştır. Ratların femurları çevre yumuşak dokulardan temizlenerek % 10'luk formalin içerisinde oda sıcaklığında fiks edilmiştir.

#### **f. Histolojik Değerlendirme:**

Doku örnekleri, pH'sı 7.0'a ayarlanmış fosfat tamponunda hazırlanmış % 10'luk formalin içinde, oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Kemik örnekleri daha sonra De Castro çözeltisinde 1-2 hafta süreyle kontrollü olarak dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyon sonrası dereceli alkollerde dehydrate edilen örnekler, parafine gömülüdür. Bloklardan, rotary mikrotomda (Microm, HM 360, Germany) 5-7 mikrometrelük kesitler alınarak boyanmıştır. Hematoksilen Eozin ve Goldner'in Masson Trikrom yöntemiyle boyanan kesitler; kemiğin genel morfolojisi, yeni kemik oluşumu ve implant doku yanıtı açısından değerlendirilmiştir. Her doku örneğinden, farklı düzeylerde elde edilen en az on kesit, iki araştırmacı tarafından Olympus (model BH-2, Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Implantın doku uyumu ile ilgili histolojik parametreler Royals ve diğerlerinin yöntemine göre skorlanmıştır (Royals, 1999). Buna göre her örnek; implantasyon bölgesindeki (defekt alanındaki) fibröz bağ dokusu oluşumu ve hücre infiltrasyonu için ayrı ayrı 0 ile 4 arasında derecelendirilmiştir. Defekt/implantasyon alanında fibröz bağ dokusu olusmamışsa ya da alan kontrol grubuya aynı görünümdeyse (0); az sayıda iğ biçimli hücre ya da hafif fibroplazi varsa (1); orta derecede bağ dokusu oluşumu varsa (2); normal doku yapısı bozulmuş/kesintiye uğramış ve orta derecede yoğun fibröz bağ dokusu varsa (3); ciddi, yoğun, kollajen açısından zengin bağ dokusu birikimi ya da nekroz varsa (4) olarak derecelendirildi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu için eğer kontrol dokusu ile farklılık yok ya da implantasyon/defekt alanında makrofaj, yabancı cisim dev hücresi, lenfosit, eozinofil, nötrofil yoksa (0); alanda lenfosit ya da makrofaj var, ancak yabancı cisim dev hücresi, eozinofil ya da nötrofil yoksa (1); bir miktar lenfosit ya da makrofaj, az sayıda yabancı cisim dev hücresi ve küçük bir nötrofil odağı varsa (2); çok sayıda lenfosit, makrofaj ve yabancı cisim dev hücresi ve belirgin sayıda

nötrofil ve eozinofil varsa (3); implanta karşı ciddi hücre infiltrasyonu ya da nekroz varsa (4) olarak skorlanmıştır.

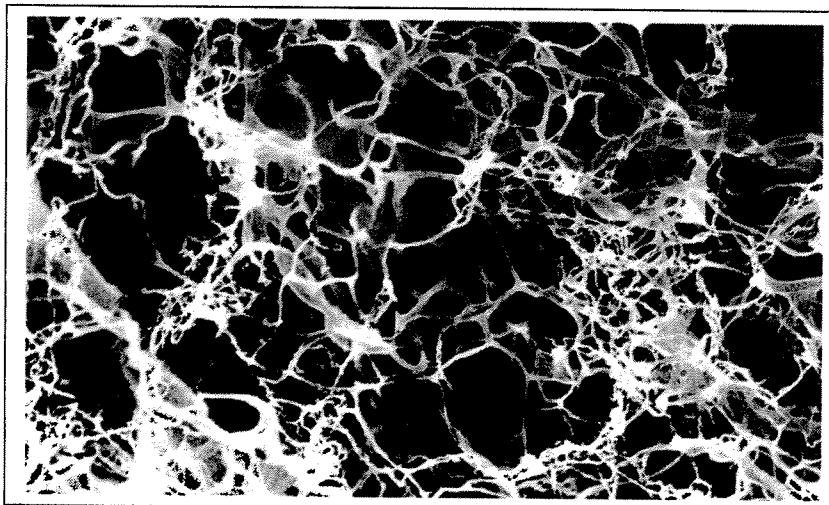
### **Radyolojik Değerlendirme**

Fisher Imaging HF-X (Denver, CO, USA) mammography cihazı ile Agfa Mamoray MR3-II (Belçika) filmleri üzerinde konvansiyonel X ışınları oluşturulmuştur. Işın kaynağının kemiklere uzaklığı 75 cm olarak ayarlanmıştır. Cihaz 25 kV, 100 mA and 160 mAs değerlerine ayarlanmıştır. Filmler Ecomat 21 (ELK Medical Products, Tokyo, Japonya) otomatik cihazı ile oluşturulmuştur. Her kemik anterior-posterior ve lateral yönlerde işına maruz bırakılmıştır. Hasar iyileşmesi 0 - 3 aralığında derecelendirilmiştir. Hiç iyileşme olmadığı durumlarda 0, 1/3, 2/3, 3/3 iyileşme olan durumlarda da hasar sırasıyla 1, 2, 3 olarak derecelendirme yapılmıştır. Filmler, gruplar hakkında bilgi sahibi olmayan iki radyolog tarafından değerlendirilmiştir. Farklı puanlamalar yapıldığı durumlarda ortalamalar alınarak değerlendirme yapılmıştır.

## **SONUÇLAR**

### **Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile Yüzey İncelenmesi**

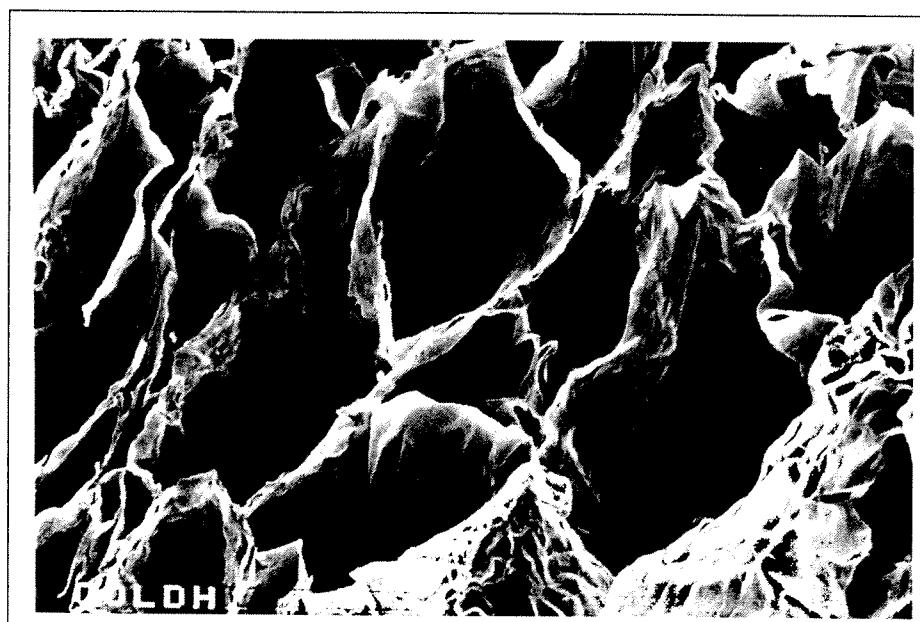
Hazırlanan hidrojellerin kesit ve yüzey yapıları taramalı elektron mikroskopu ile incelenmiştir. Liyofilize edilmiş kollajen hidrojellerinin çok sıkı olmayan bir yapıya sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3). Bu da projede belirtilen ısı ve kimyasallar yardımıyla çapraz bağlama yapılması işleminin gerekliliğini göstermektedir. Aynı hidrojelin dehidrotermal yöntemle çapraz bağlanması yüzeyde daha sıkı ve düzgün (pürüzsüz) bir yapı oluşturmuştur (Şekil 4). Aynı örneğin kesitinden ise yapının homojen gözeneklere sahip olduğu görülmüştür (Şekil 5). Dehidrotermal olarak çapraz bağlanan hidrojeller, kondroitin sülfatın varlığında kimyasal yöntemle tekrar çapraz bağlanmış (Şekil 6) ve yüzeyin Şekil 4'teki düzgünlüğünü kaybettiği görülmüş, yüzeyde oluşan bu yeni görüntünün kondroitin sülfatın çapraz bağlanması sonucu olduğu düşünülmüştür.



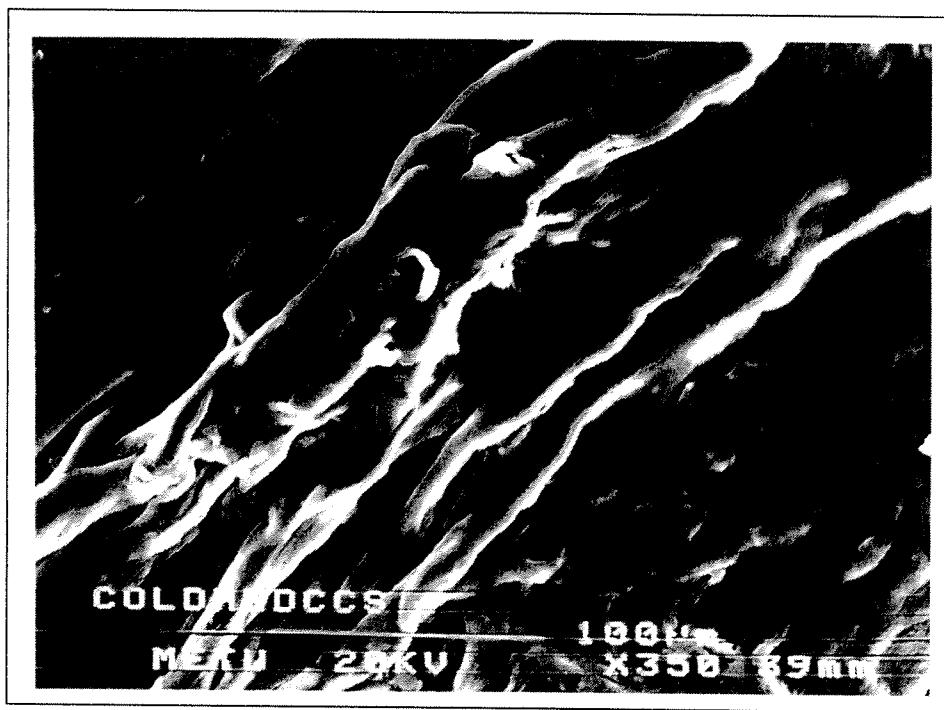
Şekil 3. Kollajen hidrojelin SEM görüntüsü (x 350)



Şekil 4. Kollajen hidrojelinin dehidrotermal uygulamasından sonra üst yüzeyinin SEM görüntüsü (x 350)



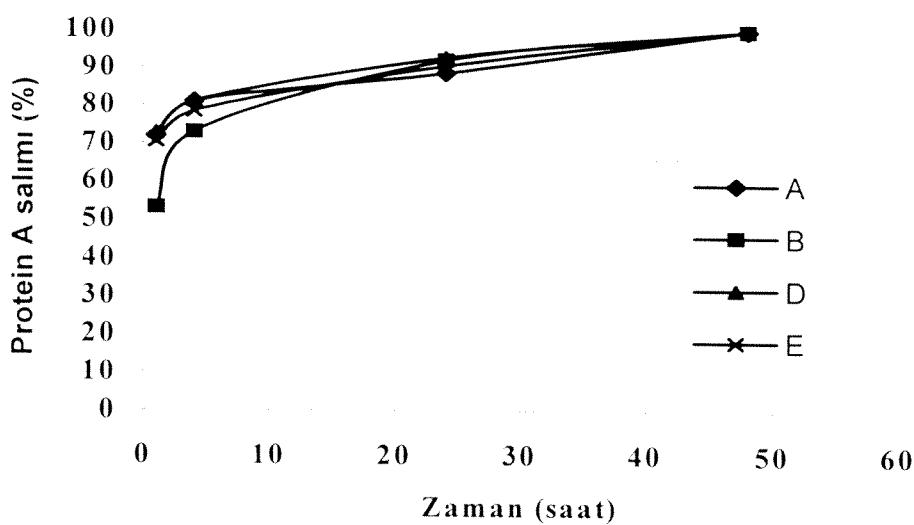
Şekil 5. Kollajen hidrojelinin dehidrotermal uygulamasından sonra yan yüzeyinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü (x 350)



Şekil 6. Dehidrotermal uygulama ve kimyasal yöntem ile çapraz bağlanmış kollajen hidrojelinin üst yüzeyinin SEM görüntüsü (x350)

#### **Protein A yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin *In Situ* Salım Kinetiği**

Model ilaç olan Protein A ile yapılan *in situ* deneyler sonucunda Protein A salımının bütün örneklerde çok hızlı olduğu (Şekil 7) ve kimyasal yöntemle çapraz bağlama aşamasında kondroitin sülfat eklenen hidrojellerin 2 gün içerisinde şeklini ve bütünlüğünü kaybettiği görülmüştür. Hidrojellerin daha uzun süre şeklini koruyabilmesi için bundan sonraki çalışmalarda kondroitin sülfatın başlangıç aşamasında kullanıldığı (Tablo 1) örnek hazırlanmasına karar verildi. Ayrıca salımın yavaşlatılması amacıyla ilerideki çalışmalarda yüklemenin kimyasal çapraz bağlama aşamasında yapılması karar verildi.

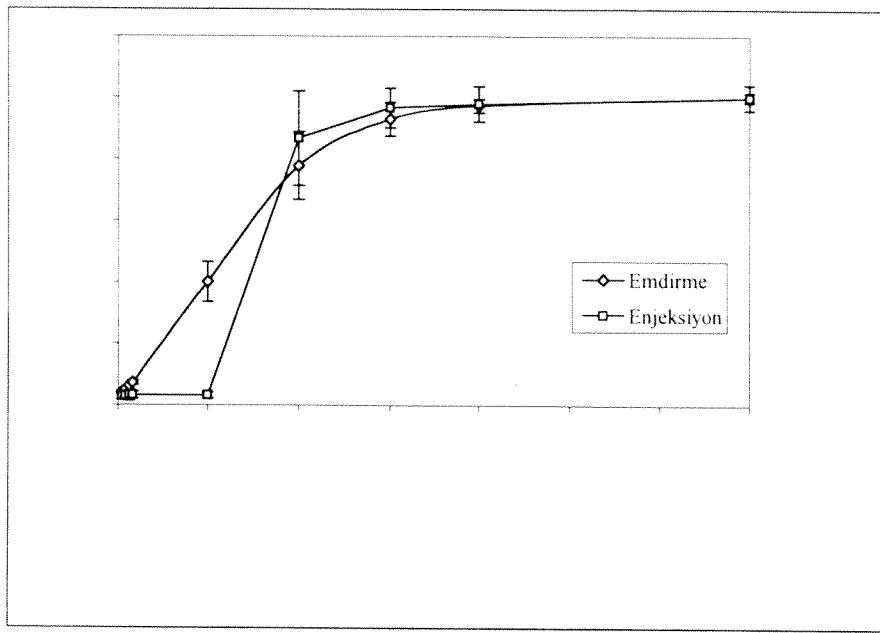


Şekil 7. Tablo 1 ‘deki Kollajen hidrojellerinden Protein A salım profilleri

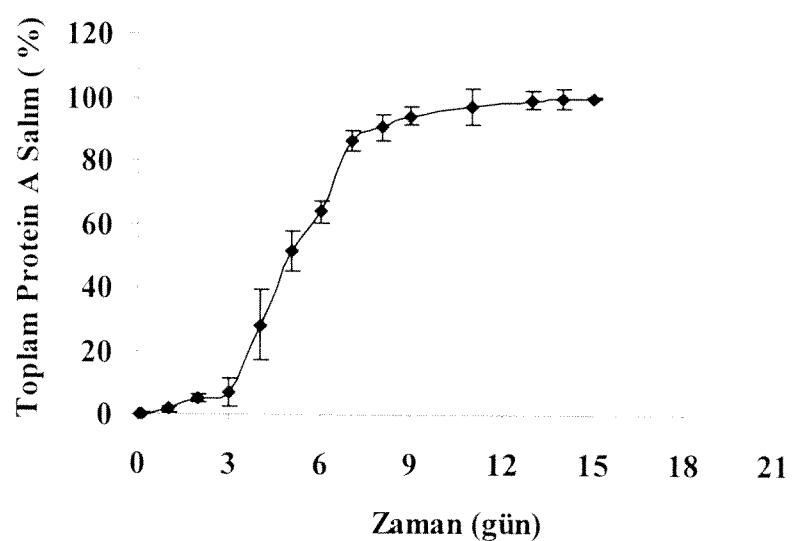
#### **Protein A Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin *In Situ* Salım Kinetiğinin Optimizasyonu**

Tablo 1 deki örneklerle fosfat tampon çözeltisi (3 mL, 0.1 M, pH 7.4) içinde, 37°C’de yapılan *in situ* salımlarda Protein A salımının bütün örneklerde çok hızlı olduğu gözlendi (ilk günde içeriğin % 90’ı salındı). Salımın yavaşlatılması amacıyla çalışmalarda kimyasal çapraz bağlayıcıların konsantrasyonları iki kat artırıldı ve hazırlanan kollajen hidrojelleri (% 6 kollajen + 0.6 % kondroitin sülfat) üzerine % 10’luk PLLA çözeltisi ile üç aşamada kaplama yapıldı. Protein A yüklenmesi kaplamadan önce enjeksiyon veya vakumla emdirme yöntemleriyle yapıldı. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından alınan örneklerdeki Protein A miktarı spektroflorimetrik yöntemle tayin edildi. PLLA ile kaplama sonucunda Protein A salımının iki güne uzatılabildeği gözlendi. (Şekil 8). Yükleme yöntemi olarak emdirme yönteminin enjeksiyona oranla daha etkili olduğu görüldü. Kollajen hidrojelinin şişme kapasitesi göz önüne alınarak salımı daha yavaşlatmak amacıyla PLLA kaplamasına esneklik kazandırılması ve kırılmasının önlenmesi düşünüldü. Bu nedenle PLLA’ya ek olarak kaplama işleminde sükroz asetat izobutirat (SAIB, küçük moleküller ağırlıklı bir

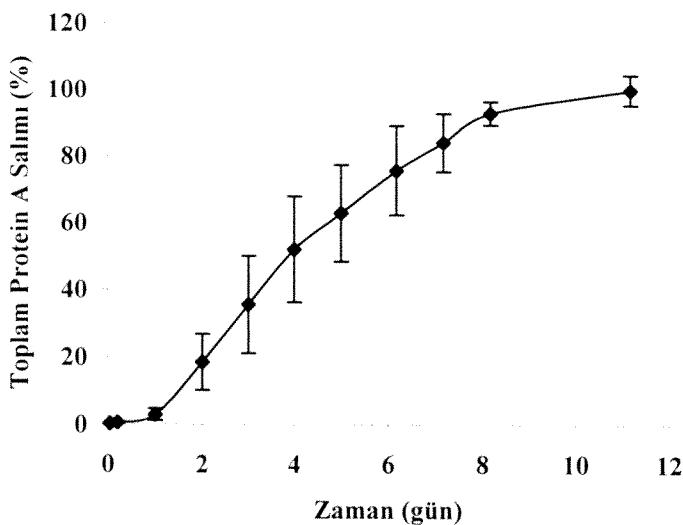
gıda katkı maddesi) 1:1 oranlarında kullanılarak daha esnek bir kaplama oluşturuldu. Aynı koşullarda salım kinetiği incelendi (Şekil 9). Protein A salımının çok yavaşladığı ve içeriğin tamamının 11 gün içinde salındığı görüldü.



Şekil 8. PLLA kaplı kollajen hidrojellerinden Protein A salım profilleri



Şekil 9. PLLA/SAIB (3 kez) kaplı kollajen hidrojellerinden Protein A salım profili



Şekil 10. PLLA/SAIB (2 kez) kaplı kollajen hidrojellerinden Protein A salım profili

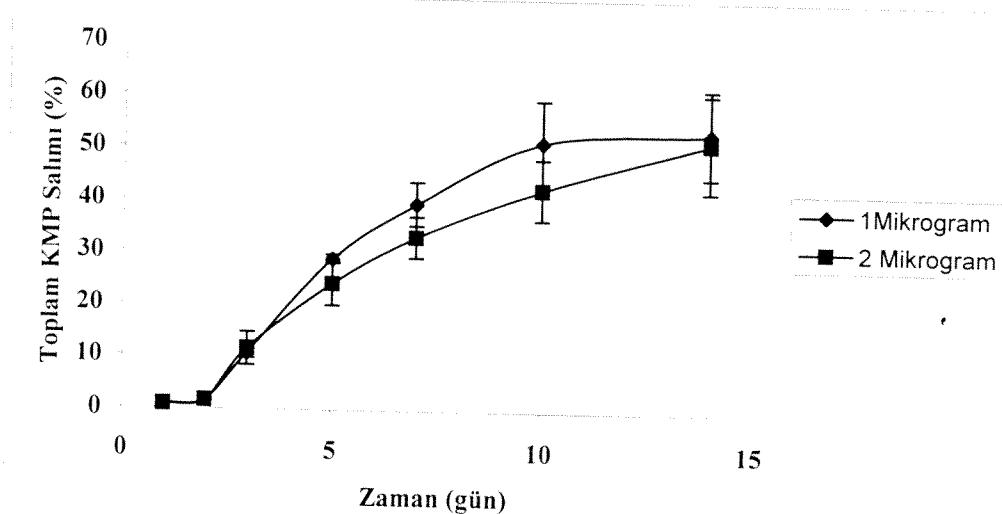
#### Kemik Morfojenik Proteini (KMP) Yüklü Kollajen-Kondroitin Sülfat Hidrojellerin *İn Situ* Salım Kinetiğinin İncelenmesi:

KMP salım grafiği (Şekil 11) aynı sistemden Protein A salım grafiği (Şekil 10) ile karşılaştırıldığında her iki grafikte de gözlenen ve üç kez kaplı sistemde (Şekil 9) daha belirgin ortaya çıkan başlangıçtaki bekleme süresinin (lag period) hidrojellerin su alma ve şişme zamanları ve dolayısıyla etken maddenin difüzyonundaki gecikmeden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kümülatif KMP salımının Protein A'ya göre yaklaşık iki kat daha yavaş olduğu görülmüştür. Bu etken maddenin daha uzun süre kemiğe bırakılmasını sağlayacağı için *in vivo* salım deneyleri için daha tercih edilen bir salım profili vermektedir. KMP'nin salımı grafikte 15 gün için verilebilmistir. Bu süre içinde yaklaşık % 60 'ının salındığı görülmüştür.

Daha önce yapılmış bir araştırmada karbodiimidin kondroitin sülfatı kollajene kovalent olarak bağladığı gösterilmiştir (Pieper, 1999). Bu sonuca benzer bir sonuç çalışmamızda da gözlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi kollajen diskleri kondroitin sülfat olmadan dayanıklılığını çok çabuk kaybederek tüm yapının tampon çözeltide 1 günlük inkübasyonda dağılmasıyla kondroitin sülfatın yapıyı korumaktaki önemini vurgulamaktadır. Protein A yüklü kollajen-kondroitin sülfat disklerinin PLLA (% 10) ile kaplanması ise salım hızını öncekine göre yavaşlatmış ancak yine de salım hızı

kaplamanın iç kısmına suyun alınması ve kollajenin burada şişerek dışardaki kabuğu uyguladığı basınçla kırması nedeniyle istenilen seviyeye getirilememiştir.

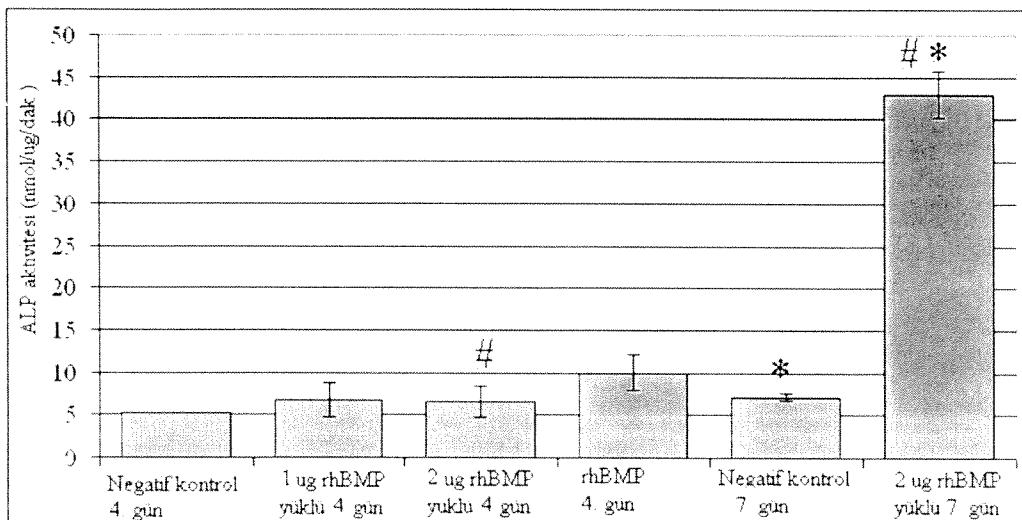
Bu yüzden, daha önce birkaç ilaç salım araştırmasında denenmiş olan sükroz asetat izobütirat (SAIB), (Burns ve ark, 1998, Knoll ve ark, 1999, Okumu ve ark, 2002), polimeri PLLA ile blend edilerek kaplamanın daha esnek olması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan Kollajen-KS diskleri Protein A içeriklerinin yarısını 5 günde (Şekil 10) salmıştır. *In situ* KMP2 'nin iki farklı dozdaki salım profilleri (1 µg and 2 µg/disk) Protein A ile yapılan ön araştırmalara benzemekte ancak belirgin şekilde daha yavaş olmaktadır (Şekil 11). Buna ikisi de kemik yapısının doğal maddeleri olan KMP ile Kollajen arasındaki artmış ve güçlü etkileşimin sebep olduğu düşünülmektedir. Bu güçlü etileşim Friess (1999) tarafından yapılan bir araştırmada da belirtilmiştir. Friess'in araştırmasında KMP yüklü Kollajen diskleri ektopik implant modelinde denemiş ve salım sisteminin proteini salımındaki başlangıçdaki 3 saatlik bir geçikme döneminin anlamlı *in vivo* sonuçlar verdiği göstermiştir. Aynı araştırma KMP'nin yapıya daha fazla girmesini sağlamak için kollajene emdirme aşamasında disklerin daha uzun süre çözeltide tutulması gerektiğini belirtmiştir. Bu projede ise süreyi uzatmak yerine protein emdirme işleminin vakumla yapılması yüksek yükleme etkinliğini sağlamıştır. Daha fazla yüklemenin ise kollajen matriks ile KMP arasında daha fazla iletişim, dolayısıyla da daha yavaş salım hızına sebep olduğu düşünülmüştür.



Şekil 11. PLLA/SAIB kaplı kollajen hidrojellerinden farklı dozlarda KMP salım profili

## In Vitro Hücre Kültürü Deneyleri

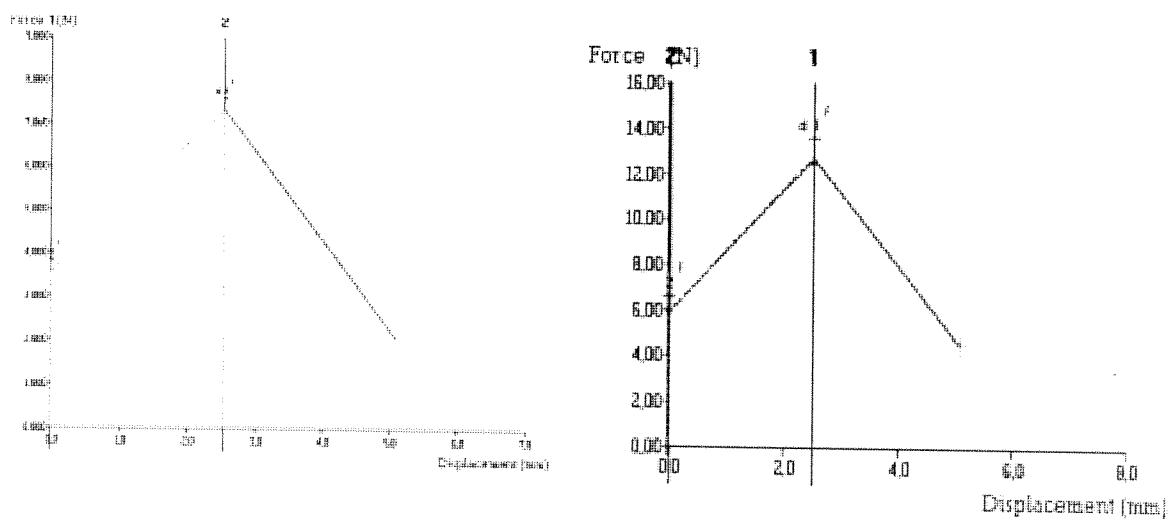
PLLA-SAIB kaplamadan kaynaklanan bir toksisiteye rastlanmamıştır. 1 ve 2  $\mu\text{g}$  KMP taşıyan disklerde ALP aktivitesi bakımından 4. günde önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 12). *In situ* deneylere göre 4. güne kadar 1  $\mu\text{g}$  implantlar yaklaşık 200 ng, 2  $\mu\text{g}$  olanlar ise bunun 2 katı (400 ng) protein salmıştır. Ancak bu örnekler arasında doza bağlı bir enzim aktivite farkı görülmemiştir. Serbest olarak 1  $\mu\text{g}$  dozda KMP uygulanan osteoblast hücrelerinde aktivite boş (implant içermeyen) kontrollere oranla 2 kat fazla enzim aktivitesi vermiştir. Kontrollü salım sistemiyle uygulanan proteinler ise boş kontrollere göre 1.3 kat fazla enzim aktivitesi vermiştir. Bu sonuçlar 4 gün (kısa sürede) serbest enzimin daha etkin sonuç verdiği belirtmektedir. 7. günde, boş implantlar çok az bir ALP aktivitesi vermiştir. 2  $\mu\text{g}$  KMP implantları ise ALP aktivitesinde kontrole göre 6 kat artış ( $p$  değeri 0.05 düzeyinde) göstermiştir. Sonuç olarak ALP enzim aktivitesinde 2  $\mu\text{g}$  KMP yüklü implantların zamana bağlı bir etkinliği olduğu görülmüştür. Bunun kontrollü salım sistemi sayesinde KMP'nin biyoyararlanımının artırılması sonucu olduğu bilinmektedir. In vitro deneylerle salım sistemi hazırlanması sırasındaki işlemlerin (vakumla emdirme ve sterilizasyon) KMP' nin kemik hücreleri üzerindeki etkisini kaybettirmediği düşünülmektedir. Buna gerekçe olarak uygulanan vakum ve UV sterilizasyon sürelerinin kısalığı (20 dk UV uygulanması) gösterilebilir. Proteinin yapısında bazı değişiklikler olmuş olması olasılığının varlığına rağmen uygulanan yöntemin protein yükleme ve sterilizasyonu için en uygun yöntem olduğu düşünülmektedir. Etilen oksit ile yapılan sterilizasyonlarda sistemin ulaştığı yüksek sıcaklığın KMP yapısına daha fazla olumsuz etkisi olacağı anlaşılmaktadır.



Şekil 12. PLLA-SAIB kaplı kollajen-kondroitin sülfat disklerinden KMP salımının *in vitro* etkisinin osteoblast hücrelerindeki ALP aktivitesiyle ölçülmesi (\*p<0.05, # p<0.05).

#### Vicryl Ağ'ın Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi:

Şekil 13'de görüldüğü gibi kalın ipliklerin (4/0) gerilme kuvveti daha ince olan (5/0) ipliklerin gerilme kuvvetine oranla daha yüksektir. Kalınlık farklılığından bekleniği üzere 4/0 ipliklerin kopma kuvvetleri daha yüksektir. Ancak kopma uzamaları kabaca aynı değer civarındadır ve temelde malzemenin aynı olduğunu göstermektedir. İki farklı kalınlıkta PLGA ipliğin ne kadar bir süre boyunca mekanik özelliklerini koruyacağı ve kırık stabilizasyonunda destek vereceğini tayin etmek için iplikler (10 ml fosfat tamponunda, bir ay süreyle, 37°C de) degradasyona bırakıldı.



(a)

(b)

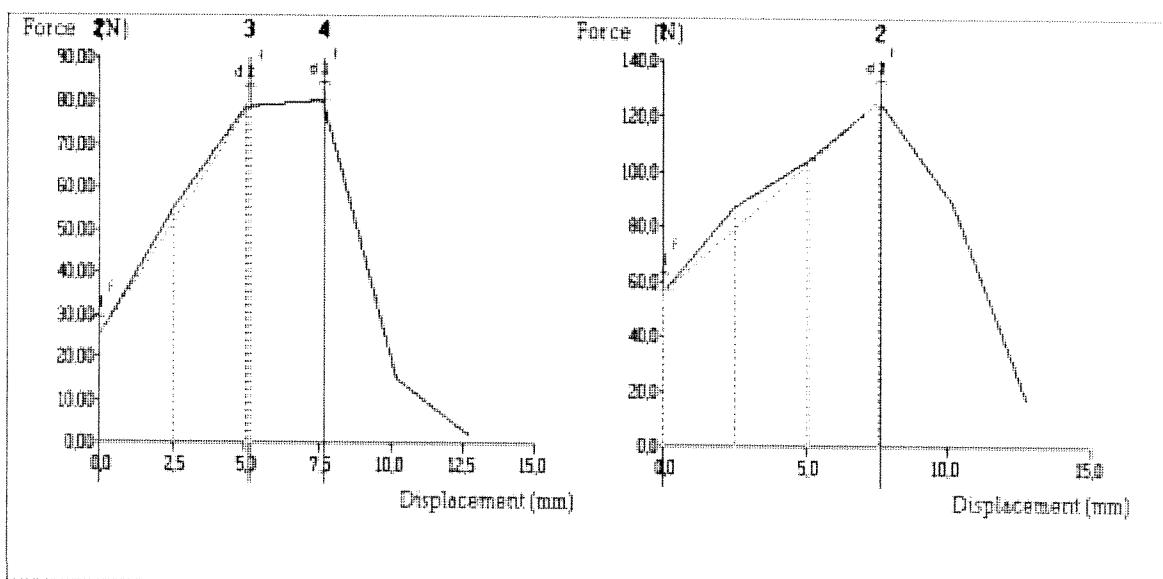
F1 (Newton)	3.575	F1(Newton)	5.818
F2 (Newton)	7.349	F2(Newton)	12.847
Uzama mesafesi (mm)	2.556	Uzama mesafesi (mm)	2.566
Eğim	1.4767	Eğim	2.727
Alan	13.39	Alan	24.03

Şekil 13. İki farklı kalınlıkta PLGA (Vicryl) iplığın gerilme test sonuçları (0.98 N kuvvet, 0.2 mm/s çekme hızı). (a) USP 5/0 , (b) USP 4/0

Bir gün, 1, 2 ve 4 haftalık inkübasyonlar sonunda iplik örnekleri alınıp ıslak halde gerilme testleri yapıldı. Dört hafta sonunda iki tip iplığın de tamamen bozunduğu görüldü. 5/0 ipliklerin iki hafta sonunda parçalanarak dağıldığı gözlenmiştir. Diğer inkübasyon sürelerindeki ipliklerinin de çekme kuvvetlerinde azalma gözlenmiştir.

1 x 8 cm boyutlarında kesilen PLGA ağların gerilme ve kopma kuvvetlerinin beklenildiği gibi ipliklere oranla çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Ağ yapılarının gerilme test profilleri de ipliklerin profilinden farklılık göstermiştir (Şekil 14). PLGA ağları oluşturan iplikler tek iplik kalana kadar teker teker kopmuştur. İpliklerin *in situ* inkübasyonu 1 günde en üst gerilme kuvvetinde kabaca % 8.54 azalmaya sebep olmuştur (Tablo 1). Bir haftanın sonunda ise aynı parametrede toplam % 70 azalma gözlenmiştir. Vicryl iplikler 2 hafta inkübasyonla bütünlüğünü kaybetmişlerdir. Fiber bağlı ağlar mekanik testler için 1cm x 10 cm boyutlarında kesilmiştir. Bunun sonucunda her teste ağlarda kuvvete paralel yönde 3 iplik olduğu ve bunun ağlara tek

ipliğin sahip olduğu gerilme kuvvetinin 3 katı kuvvet kazandırdığı, yani ağı yapının bütünü yapıya iplerdekinden farklı ek bir mekanik katkı getirmediği gözlenmiştir.



F1 (Newton)	25.105	F1(Newton)	55.89
F2 (Newton)	79.34	F2(Newton)	126.15
F3 (Newton)	80.06	F3(Newton)	88.05
Eğim	10.46	Eğim	12.17
Alan	216.60	Alan	177.30
Uzama mesafesi 5.18 (mm)		Uzama mesafesi (mm)	7.74

Şekil 14. İki farklı kalınlıkta PLGA ipliklerle (a) USP 5/0 ve (b) USP 4/0 örülmüş ağların gerilme test sonuçları (0.98 N kuvvet, 0.2 mm/s çekme hızı).

Tablo 2. Vicryl (4-0 and 5-0) sutürlerin Mekanik Özelliklerindeki Değişimler (in situ)

4-0	Kırılma Mukavemeti (N)	Young Modülü (N/mm)	Tokluk (N.mm)
0. zaman	12.30±0.35	2.41±0.22	23.90±0.34
1. Gün	12.51±1.08	1.66±0.07	54.00±1.56
1. Hafta	5.08±1.53	2.21±0.34	5.63±4.61
2. hafta	0.70±0.41	-	-
5-0	Kırılma Mukavemeti (N)	Young Modülü (N/mm)	Tokluk (N.mm)
0. zaman	6.97±0.42	1.48±0.23	13.90±1.36
1. Gün	5.35±2.51	1.36±0.67	18.27±16.50
1. Hafta	2.39±0.67	1.87±0.31	1.50±0.16

Tablo 3. Vicryl (4-0 and 5-0) Sutürler ile Örülen Ağların Mekanik Özellikleri

Ağ İplik Türü	Kırılma Mukavemeti (N)	Young Modülü (N/mm)	Tokluk (N.mm)
4-0	118.63±17.51	9.59±2.87	672.06±89.95
5-0	78.32±1.14	6.96±3.03	713.30±145.9

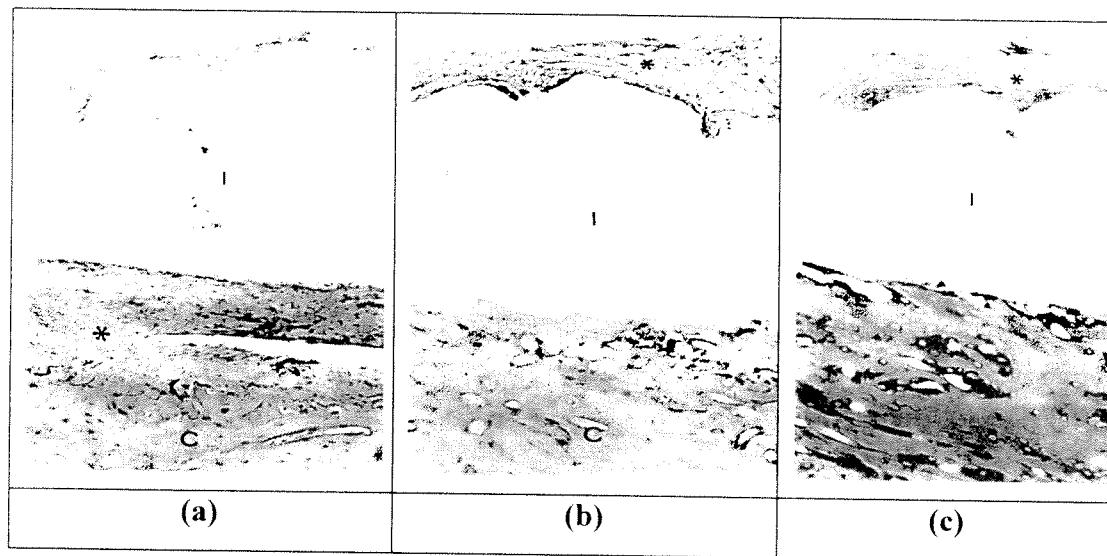
#### Bir Haftalık In Vivo Uygulamaların Histolojik Sonuçları:

Kontrol ve deney gruplarına ait tüm doku örneklerinde defekt alanı kortikal kemik içerisinde izlendi. Polimerik ağ ile sarılmış örneklerde ağ parçalarına ait kesitler, defekt bölgesi çevresinde, periosteal dokunun periferinde, etrafları bağ dokusundan yapılmış fibröz kapsüllerle sarılmış olarak gözlendi. Polimerik ağ parçaları genellikle fibroblastlardan oluşan, bazen az sayıda fagositik hücre içerebilen ince fibröz bir doku ile çevriliydi. Fagositik hücrelerin varlığı, defekt bölgesindeki periosteal kemikleşmeyi etkilemedi.

KMP içeren ya da içermeyen implant uygulanmış gruplarda, defekt alanında kollajen-kondroitin sülfat'a ait parçalar ya da polimerin dekalsifikasyon süreci sonrası degrade olması sonucu bıraktığı boşluklar dikkati çekti. Deney gruplarının hiçbirinde kollajen-kondroitin sülfat'a ait yabancı cisim reaksiyonu ya da belirgin bir doku yanıtına rastlanmadı. İmplante edilmiş kollajen-kondroitin sülfat implantları tüm örneklerde, kortikal kemik içinde, yeni oluşan periosteal kemikleşme alanlarıyla yakın komşulukta izlendi. İmplantasyon materyali olarak uygulanan kollajen-kondroitin sülfat implantları ve defekt bölgesini dışarıdan sararak destekleme amaçlı kullanılan polimerik ağlar biyoyumlu ydu. KMP içeren ya da içermeyen kollajen-kondroitin sülfat ve polimerik ağın doku uyumluluğunu ait histolojik parametrelerin skorlandığı tablo aşağıda verilmiştir (Tablo 2). Kontrol ve deney gruplarının tümünde defekt alanına komşu kortikal kemik bölgesi normal görünümdeydi. İlik boşluğu örneklerin tümünde, kortikal kemiğe komşu alanda sağlıklı olarak bütünlüğünü korumaktaydı ve defekt alanıyla bağlantısız olarak gözlendi.

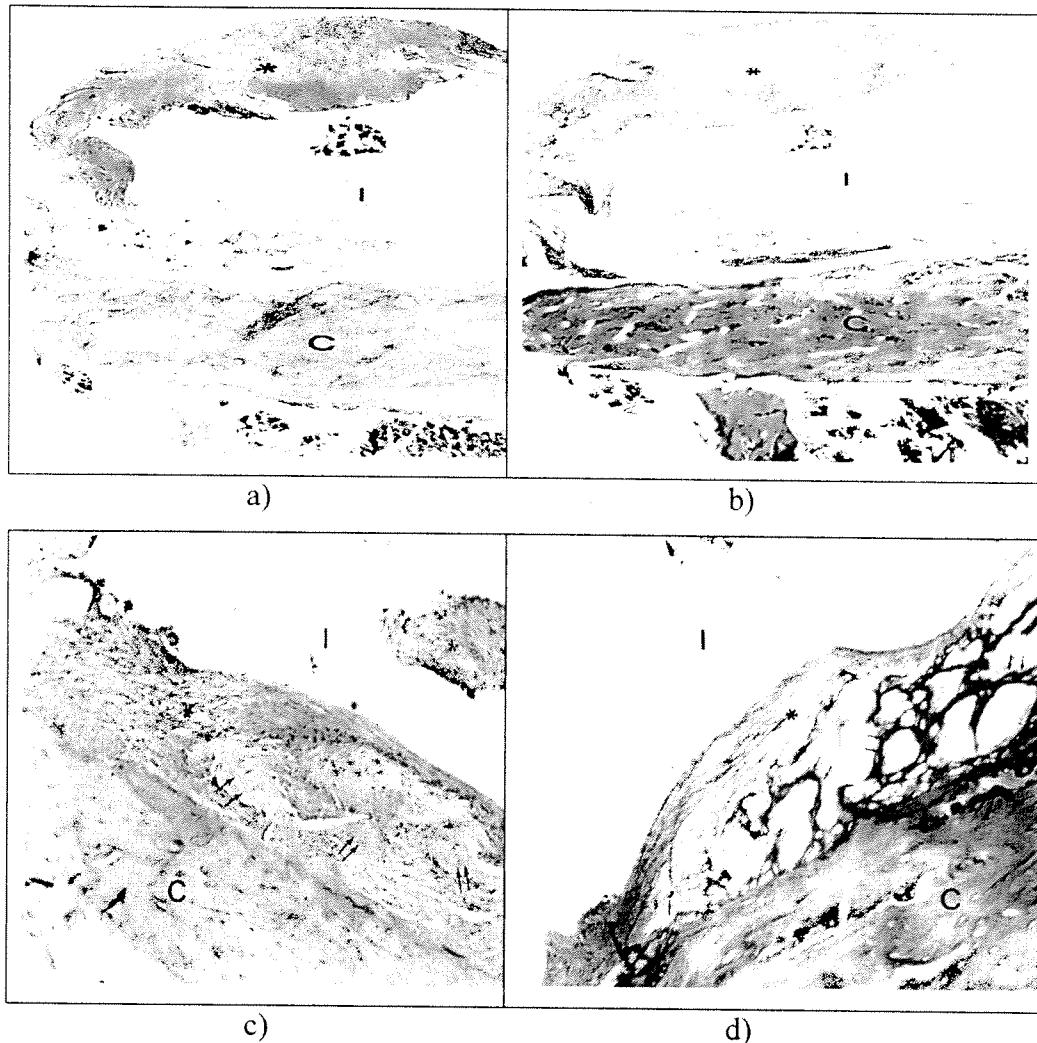
Birinci haftanın sonunda 1 ve 2 µg KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant uygulanan gruplarda, defekt alanına komşu kortikal kemiğin hücre açısından zengin tıkanık bağ dokusu ile çevrili olduğu gözlendi (Şekil 15 a-c, 16 a-d). Bağ dokusunun yer yer implantın içine doğru ilerlediği alanlara rastlandı. İki mikrogram KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant grubunda, osteojenik potansiyelli bağ dokusu hücrelerinin, genç kemik trabeküllerini yapılandırdığı alanlar gözlendi. Bu alanlarda, yeni oluşan kemik spikülleri olgun kortikal kemik ile devamlılık gösterecek derecede iyi

düzenlenmişti (Şekil 16 c, d). Diğer yandan KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant uygulanan her iki grupta, yüzeyde yer yer polimerik ağ ile sarılı, ileri derecede kalınlaşmış, hücre açısından zengin, mitotik olarak aktif periost katmanı dikkati çekti (Şekil 16a, b).



Şekil 15. Bir mikrogram KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant grubundan, birinci hafta sonunda elde edilen kesit mikrografları.

C: Kortikal kemik, I: İmplant, (\*): Kalınlaşmış periosteal bağ dokusu. x10, H&E, Masson Trikrom.

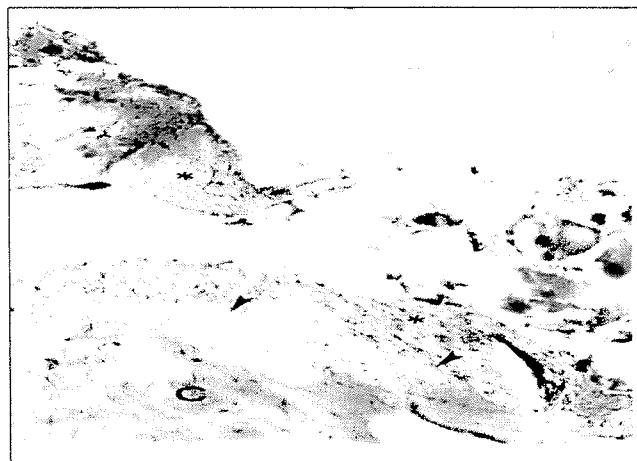


Şekil 16. a, b) İki mikrogram KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant grubunun, birinci hafta sonuna ait panoramik kesit mikrograflarında defekt alanı görülmektedir. (c, d): Aynı grupta kortikal kemik komşuluğunda bağ dokusu içinde yapılan genç kemik trabekülleri izlenmektedir.

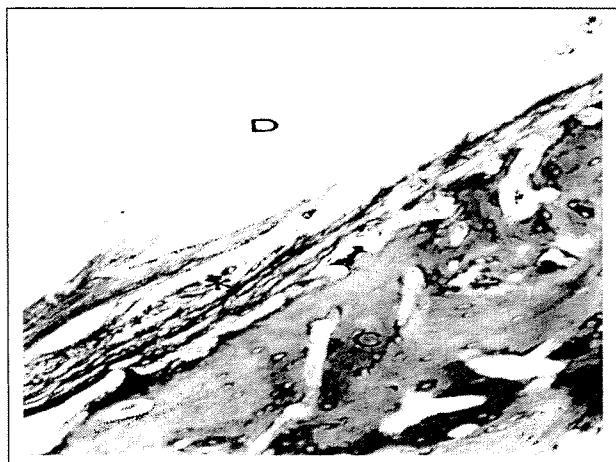
C: Kortikal kemik, I: İmplant, (\*): Kalınlaşmış periosteal bağ dokusu. Ok: Kemik trabekülleri. x4, x4, x10, x10, H&E, Masson Trikrom.

Birinci haftanın sonunda, yalnızca kollajen-kondroitin sülfat implant uygulanan grupta, defekt alanına bitişik kortikal kemik komşuluğundaki hücre açısından zengin bağ dokusu katmanı KMP içeren grupta karşılaştırıldığında yaklaşık eşit kalınlıkta olmasına rağmen, KMP içeren gruptaki kadar iyi organize olmamıştı.

Kortikal kemik komşuluğunda yer yer kıkırdak alanlarına rastlandı (Şekil 17). Defekt alanının boş bırakıldığı gruba ait doku örneklerinde, kortikal kemiğe komşu bağ dokusu katmanın diğer gruplara göre oldukça ince olduğu saptandı (Şekil 18).



Şekil 17. Kollajen-kondroitin sülfat implant grubundan birinci haftanın sonuna ait mikrograf. C: Kortikal kemik, I: İmplant, (\*): Kalınlaşmış periosteal bağ dokusu. Ok başı: Kıkırdak alanları. x10, H&E



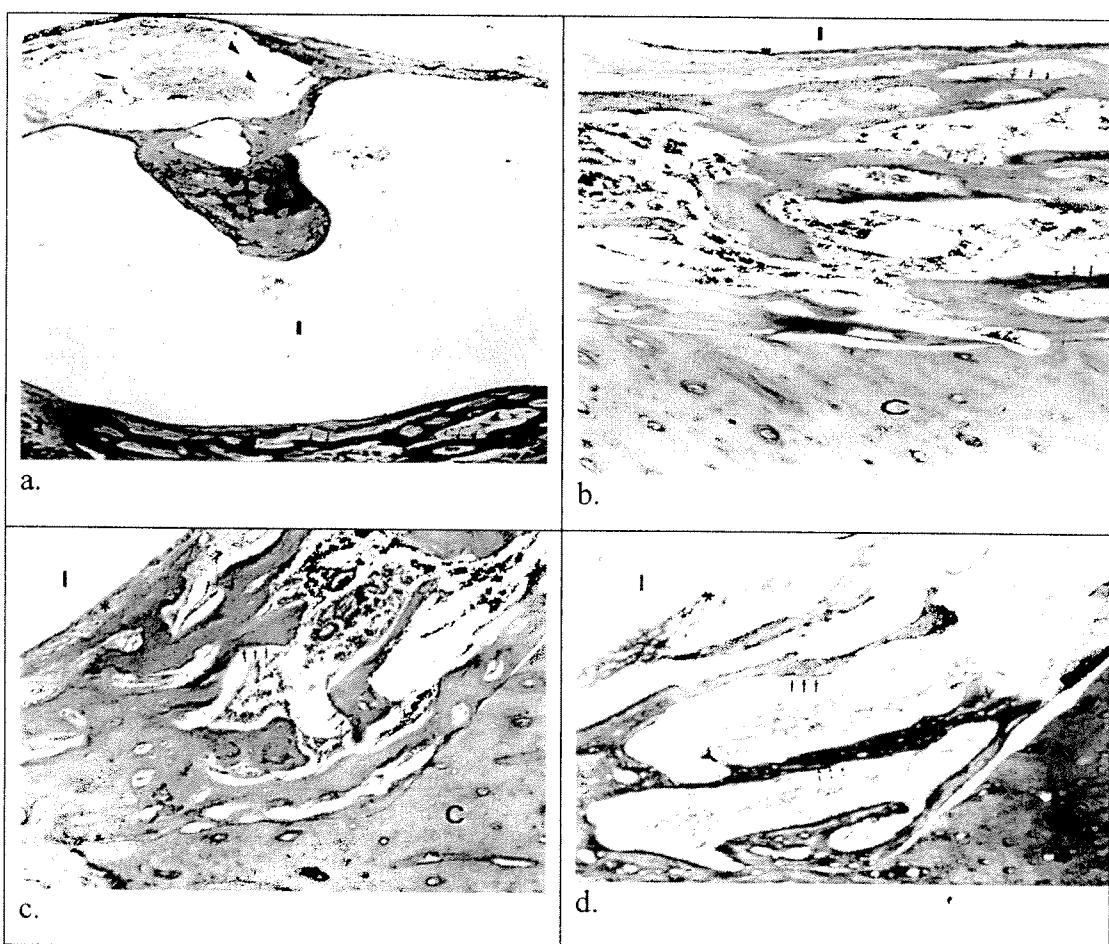
Şekil 18. Kontrol grubuna ait kesit mikrografında birinci haftanın sonunda, kortikal kemik (C) komşuluğundaki ince periosteal bağ dokusu (\*) izlenmektedir. D: Defekt alanı. x10, Masson Trikrom

#### Üç Haftalık In Vivo Uygulamaların Histolojik Sonuçları:

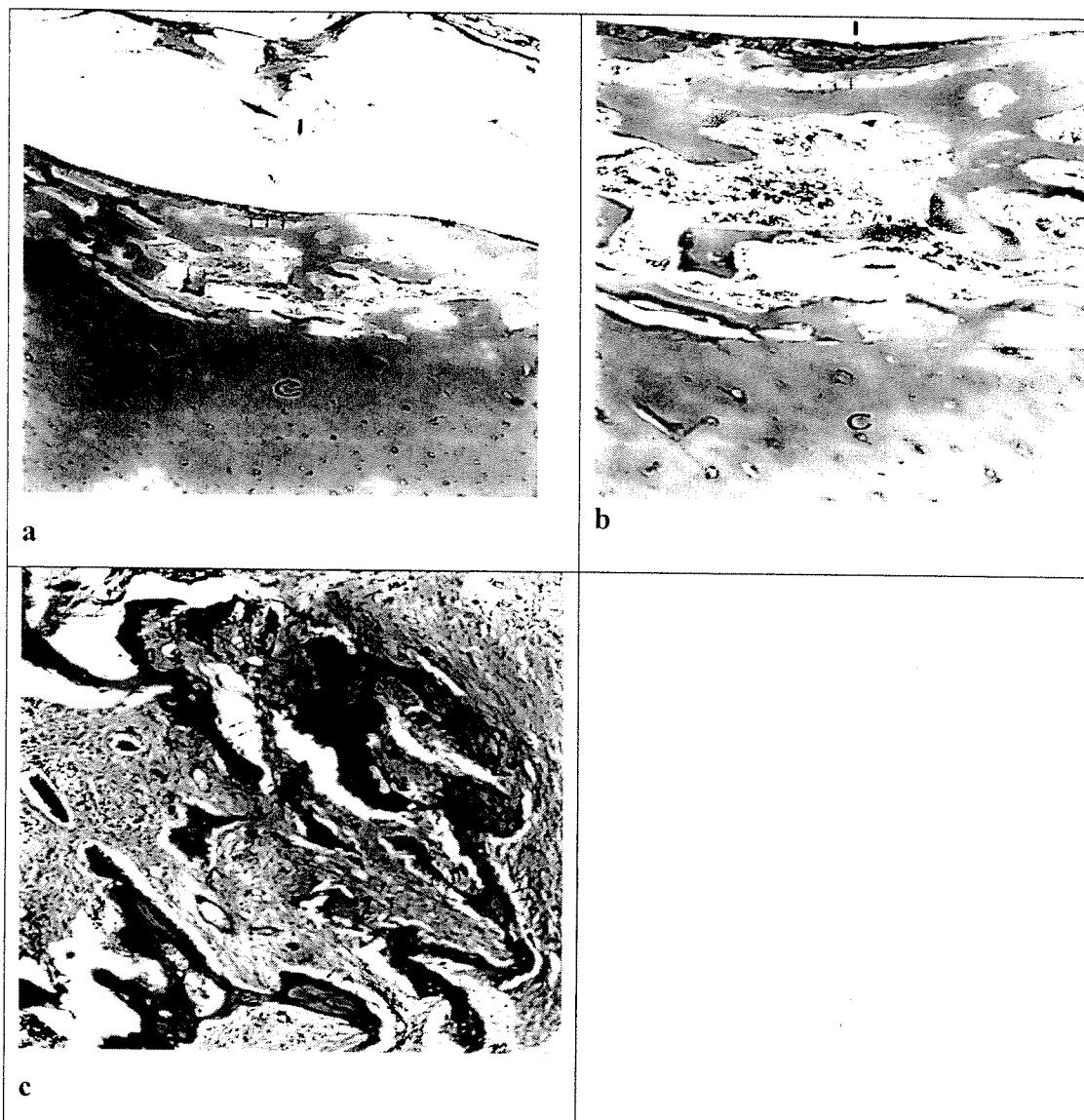
Üçüncü haftanın sonunda, 1 ve 2 mikrogram KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant gruplarında defekt bölgesine komşu kortikal kemiğin, çepeçevre, kalın ve oldukça düzenli spongyöz kemik dokusu ile kuşatıldığı saptandı. Bu bölgedeki kemik

trabekülleri, çeperlerindeki aktif görünümlü osteoblastları, rezorptif osteoklastları ve yer yer aralarını dolduran ilik alanlarıyla oldukça iyi organizeydi. Periosteum, implant komşuluğunda fizyolojik koşullarda olduğu gibi ince ve fibröz bir bağ dokusu katı görünümünü kazanmış olarak gözlendi (Şekil 19 a-d, 20 a-d).

Kollajen-kondroitin sülfat'ın, polimerik ağ ile destekli dış kısmında, ileri derecede kalınlaşmış, mitotik olarak aktif periosteum içinde, yer yer yeni kemik trabeküllerinin yapılandığı (Şekil 20d), ancak tıkanız bağ dokusu alanlarının, polimerik ağ çevreleyen enkapsülasyon alanlarını barındırır biçimde çoğunlukta olduğu saptandı (Şekil 19a, 20c).



Şekil 19. KMP ( $1 \mu\text{g}$ ) içeren kollajen-kondroitin sülfat implant grubunda üçüncü haftanın sonunda defekt alanı. (a): Panoramik görüntüde defekte komşu, polimerik ağ ile destekli, dışındaki periosteal katın, merkezde, implantın içine doğru uzandığı izleniyor. Ağ çevresindeki fibröz enkapsülasyona dikkat edilmelidir. (b-d): Kortikal kemik komşuluğundaki genç spongyoz kemik dikkati çekmektedir. C: Kortikal kemik, I: İmplant, (\*): İncelmiş periosteal bağ dokusu. Ok: Kemik trabekülleri. x4 , Ok başı: Polimerik ağ. x4, x4, x10, x10, H-E, Masson Trikrom.

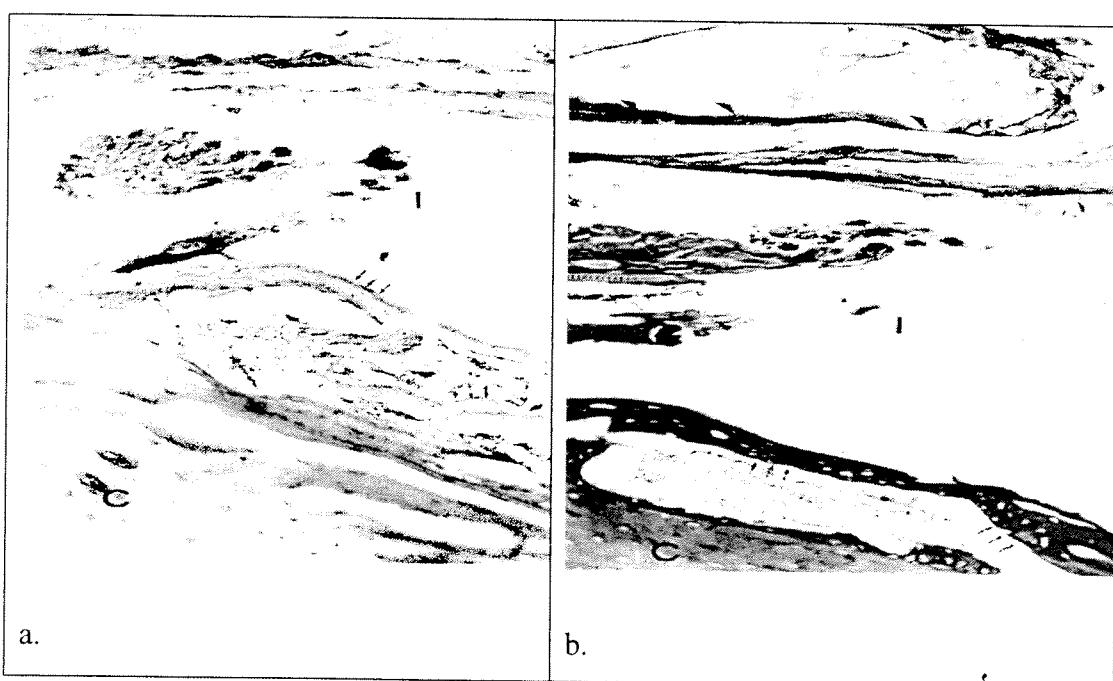


Şekil 20. KMP ( $2 \mu\text{g}$ ) içeren kollajen-kondroitin sülfat implant grubunda üçüncü haftanın sonunda (a)'da panoramik olarak, (b)'de, daha büyük büyütmede, defekte komşu, iyi düzenlenmiş süngerimsi kemik gözleniyor. (c)'de dış kısımdaki kalınlaşmış, mitotik olarak ileri derecede aktif periost içinde genç kemik trabeküllerinin olduğu alanlar görülmektedir. C: Kortikal kemik, I: İmplant, (\*): İncelmiş periosteal bağ dokusu. Ok: Kemik trabekülleri. x4, x10, x10, H&E

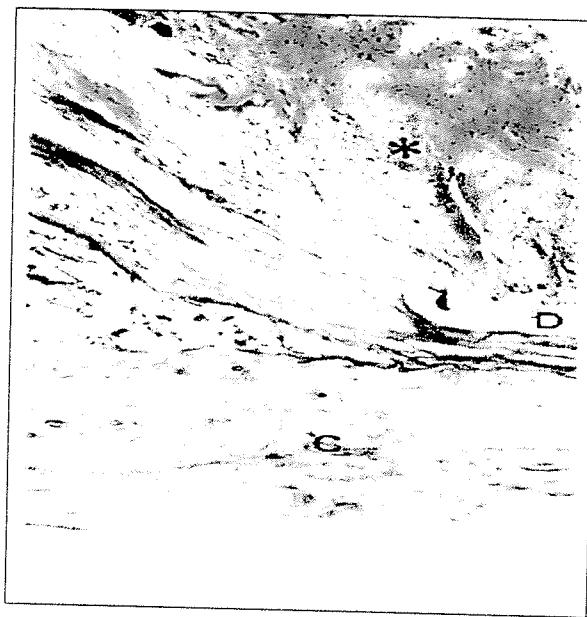
KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implant gruplarında, üçüncü haftanın sonunda elde edilen bu yapısal görüntü, polimerin hem doku ile ileri derecede uyumlu olduğunu göstermesi açısından; hem de KMP ile beraber osteojenik stimülatör etkisinin optimum olması açısından anlamlıydı. Farklı dozlarda uygulanan KMP'nin, ilk haftada periosteal kemikleşmeyi uyarıcı etkisinin doz bağımlı olduğu varsayılabılırse de, üçüncü haftanın

sonunda, uygulanan iki dozun, histolojik açıdan birbiriyle anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı. Bu *in vivo* homeostatik mekanizmaların KMP'nin etkisini antagonize ettiğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Üçüncü haftanın sonunda, yalnız kollajen-kondroitin sülfat implant uygulanan gruba ait doku örneklerinde, defekt alanına komşu kortikal kemik çevresinde gevşek bağ dokusu içinde genç kemik trabeküllerinin geliştiği, ancak oluşan spongyöz kemik dokusu katının KMP'li gruplara göre belirgin olarak daha ince ve prematür olduğu izlendi. Defekt alanının polimerik ağ ile desteklendiği dış kısımda periosteal bağ dokusunda kemik trabeküllerine rastlanmadı. Bu alanda fibröz kapsüllerle çevrili polimerik ağ kesitleri izlendi (Şekil 21 a, b). Defekt alanının boş bırakıldığı grupta, gerek kortikal kemiğe komşu iç kısımda, gerekse periost komşuluğundaki dış kısımda, birinci haftaya göre daha kalın ve hücreden zengin ve mitotik olarak aktif periosteal bağ dokusu izlendi (Şekil 22). Yeni kemik oluşumu gözlenmedi.



Şekil 21. Kollajen-kondroitin sülfat implant grubundan üçüncü haftanın sonuna ait mikrograflar. Polimerik ağın çevresindeki fibröz enkapsülasyon dikkat çekmektedir. C: Kortikal kemik, I: İmplant, Ok: Prematür kemik spikülleri, Ok başı: Polimerik ağ. x10, H-E, Masson Trikrom



Şekil 22. Kontrol grubuna ait kesit mikrografında üçüncü haftanın sonunda, kortikal kemik (C) komşuluğunda ileri derecede selüler kalınlaşmış periost (\*) izlenmektedir. Görüntü, periostun en kalın olduğu elde edilmiştir. D: Defekt alanı. x10, H-E

**Tablo 4:** Implantın doku uyumluluğunun histolojik olarak skorlanması. **Grup 1:** 1 µg KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implantın 1 haftalık izlemi; **Grup 2:** 1 µg KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implantın 3 haftalık izlemi; **Grup 3:** 2 µg KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implantın 1 haftalık izlemi; **Grup 4:** 2 µg KMP içeren kollajen-kondroitin sülfat implantın 3 haftalık izlemi; **Grup 5:** Yalnız kollajen-kondroitin sülfat içeren implantın 1 haftalık izlemi; **Grup 6:** Yalnız kollajen-kondroitin sülfat içeren implantın 3 haftalık izlemi; **Grup 7:** Kontrol grubunun 1 haftalık izlemi; **Grup 8:** Kontrol grubunun 3 haftalık izlemi.

Implant	Parametre	Grup 1 (n=2)	Grup 2 (n=2)	Grup 3 (n=2)	Grup 4 (n=4)	Grup 5 (n=2)	Grup 6 (n=1)	Grup 7 (n=1)	Grup 8 (n=1)
Kollajen-Kondroitin oluşumu	Fibröz bağ dokusu	1, 1	1, 1	1, 1	0, 0, 0, 1	0, 1	1	0	0
	Inflamatuvar hücre infiltrasyonu	1, 1	1, 1	1, 1	1, 1, 1, 1	1, 1	1	0	0
Sülfat oluşumu	Fibröz bağ dokusu	2, 2	2, 2	2, 2	2, 2	2, 2	2	0	0
	Inflamatuvar hücre infiltrasyonu	1, 2	1	1, 2	1, 1, 1, 2	2, 2	1, 2	0	0
Polimerik ağ	Fibröz bağ dokusu								
	Inflamatuvar hücre infiltrasyonu								

## Radyolojik Sonuçlar

Radyolojik sonuçlar deney grupları ve zaman değişkeni arasında anlamlı bir etkileşim olduğunu göstermektedir ( $F(3,19) = 3.9$ ,  $p < 0.05$ ). Ayrıca zamanın grup değişkenlerine ana etkisi de anlamlı bulunmuştur ( $F(3,19) = 3.8$ ,  $p \leq 0.05$ ;  $F(1,19) = 8.3$ ,  $p < 0.05$ ). Radyolojik değerlendirmeler sonucu kemik defektinin iyileşmesi  $2 \mu\text{g}$  KMP taşıyan implant grubunda 1 haftada diğer gruptan istatistiksel olarak daha iyi sonuç vermiştir. Üç hafta sonunda,  $1 \mu\text{g}$  KMP taşıyan implant gruplarının radyolojik puanları  $2 \mu\text{g}$  KMP'li implantlarla aynı düzeye ulaşmıştır. Her iki KMP grubunun puanlarının yalnız polimer ve yalnız hasar içeren her iki kontrol grubundan daha yüksek olduğu bulunmuştur. (Tablo 3).

**Tablo 5. Radyolojik Bulgular**

Örnek	Zaman (hafta)	
	1	3
1 $\mu\text{g}$ KMP yüklü implantlar	$1.0 \pm 0.0^b$	$2.3 \pm 0.5^c$
2 $\mu\text{g}$ KMP yüklü implantlar	$2.2 \pm 1.6^a$	$2.3 \pm 0.6^a$
Boş Implant	$1.3 \pm 0.6^b$	$1.0 \pm 0.0^b$
Hasarlı kemik	$1.3 \pm 0.3^b$	$1.6 \pm 0.6^b$

a-b<0.5; b-c<0.5

## Değerlendirmeler

Kemik büyümeye faktörlerinin kemik hasarlarının tedavisinde kullanımını mümkün kılmak amacıyla tamamen biyoyumlu ve biyobozunur polimerler kullanılarak yeni bir kontrollü salım ve kırık stabilizasyon sistemi geliştirilmiştir. Sistemin ilaç salım hızı in situ ve in vitro ortamlarda hem model bir proteinle hemde KMP ile incelenmiş ve kemik iyileşmesi için gerekli olan sürede, özellikle ilk tedavi döneminde (ilk 15 gün) ortama yeterli KMP salınması sağlanmıştır. Bu salım sitemini hem kemik hasar bölgesinde sabitleyecek hem de kemiğe destek verecek bir Vicryl ağ yapı da istenilen özellik ve şekilde hazırlanabilmiştir. Ağ yapının mekanik özelliklerinin hazırlanmada kullanılan biyobozunur iplik kalınlıklarıyla orantılı olması ve kemik boyutuna göre değiştirilebilmesi, ilaç salım sisteminde kullanılan polimerlerin tamamen

biyoyumlu malzemeler olması ve salım hızının istemli olarak artırılıp azaltılabilmesi bu ikili sistemin kemik kırıklarının tedavisinde klinik uygulamaya sokulabileceğini düşündürmektedir.

## REFERANSLAR

Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplet G, Lazaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski PA. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable Coll-CS sponge for maxillary sinus augmentation. *Int. J. Periodon. Rest. Dent;* 17, 11-25, (1997).

Böstman, O., Pihlajamaki, H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials,* 21, 24, 2615-21, (2000).

Buckwalter, J. A., Glimcher, J., Cooper, R R., Recker, R. Bone Biology. *J.of Bone and Joint Surgery.* 77-A, 8, 1256-1275, (1999).

Burns P. J., Fleury J. J., Gibson J., Sullivan S, Tipton A. Evaluation of the SABER™ delivery system for the controlled release of deslorelin acetate for advancing ovulation in the mare: Effects of formulation & dose, *Theriogenology;*49, 1, 256, (1998).

Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in nonhuman primates. *J. Bone Joint Surg.;* 77-A, 734-750, (1995).

Franke, H., Galla, H.J., Beuckmann, C.T. Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier *in vitro*, *Brain Res Prot.* 5, 248-256, (2000).

Friess,W., Uludag, H., Foskett, S., Biron, R., Sargeant, C. Characterization of absorbable sponges as rhBMP-2 carriers. *International Journal of Pharmaceutics,* 187, 91-99, (1999).

Gogolewski, S., Pineda, L., Büsing, C. M. Bone Regeneration in segmental defects with resorbable polimeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process. *Biomaterials*, 21, 24, 2513-20, (2000).

Hasirci, V., Lewandrowski, K., Bondre, S.P., Gresser, J.D., Trantolo, D.J., Wise, D.L., High strength bioresorbable bone plates: preparation, mechanical properties and *in vitro* analysis, *Bio-medical Materials and Engineering*, 10,1, 19-29, (2000).

Holinger, J. Wong, M. E. The Integrated Process Of Hard Tissue Regeneration With Special Emphasis On Fracture Healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path. Oral Radiol. Endo.* 82, 6, 594-606, (1996).

Howell TH, Fierellini J, Jones A, Alder M, Nummikoski P, Lazaro M, Lilly L, Cochran DA. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int. J. Periodont. Restor. Dent.*; 17, 125-139, (1997).

INFUSE™ BONE GRAFT webpage [http://www.spinemd.com/print\\_version/pf-2-infuse.htm](http://www.spinemd.com/print_version/pf-2-infuse.htm)

Knoll A, Schmidt S, Chapman M, Wiley D, Bulgrin J, Blank J, Kirchner L. A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. *Microvasc Res.* Jul;58, 1, 1-9, (1999)

Kose GT, Ber S, Korkusuz F, Hasirci V, Poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices. *J. Mater. Sci.: Mater Med.*; 1, 121-126, (2003).

Lu H H., Kofron M D, El-Amin S F, Attawia M A, Laurencin C T. *In vitro* bone formation using muscle-derived cells: a new paradigm for bone tissue engineering using polymer–bone morphogenetic protein matrices *Biochem. Biophys. Res Commun.*; 13, 882-89, (2003).

Okumu FW, Dao le N, Fielder PJ, Dybdal N, Brooks D, Sane S, Cleland JL. Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER. *Biomaterials*. Nov; 23, 22, 4353-8, (2002).

Pieper, J.S., Oosterhof, A., Dijkstra, P.J., Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H., Preparation And Characterization Of Porous Crosslinked Collagenous Matrices Containing Bioavailable Chondroitin Sulphate *Biomaterials* 20, 847-858, (1999).

Probst A., Spiegel H. U., Cellular Mechanism of Bone Repair. *J. Invest.Surg.* 10, 3, 77-86, (1997).

Remedios, A. Bone and Bone Healing. *Vet. Clin. North. Am. Small Animal Pract.* 29, 5, 1029-44, (1999).

Rokkanen, P. U. ve ark. Bioabsorbable Fixation in Orthopaedic Surgery and Traumatology. *Biomaterials*, 21, 24, 2607-13, (2000).

Royals MA, Fujita SM, Yevey GL, Rodriguez J, Schultheiss PC, Dunn RL. Biocompatibility of a biodegradable *in situ* forming implant system in rhesus monkeys. *J Biomed Mater Res*; 45:231-239, (1999).

Saito N, Takaoka K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 2287-93, (2003).

Saito N, Okada T, Horiuchi H, Takhashi J, Murakami N, Nawata M, Kojima S, Nozaki K, Takaoka K. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone*, 32, 381-86, (2003).

Solchaga, L.A., Gao, J., Dennis, J.E., Landberg, M., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., Treatment Of osteochondral Defects with Autologous Bone Marrow In A Hyaluronan Based Delivery

Vehicle, 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida, March 12-15, (2000).

Stankewich, C.J., Swionkowski, M.F., Tencer, A. F., Yetkinler, D. N., Roser, R.D. Augmentation Of Femoral Neck Fracture Fixation With An Injectable Calcium -Phosphate Bone Mineral Cement. 42. Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Atlanta, Georgia. Feb. 19-22, (1996).

Taxel, P. Osteoporosis: Detection, Prevention, And Treatment In Primary Care. Geriatrics, 53, 8, 22-3, (1998).

Whang K. ve ark. A Biodegradable Polymer Scaffold for Delivery of Osteotropic Factors. Biomaterials, 21, 24, 2545-2551, (2000).

Winn, S., Uludağ, H., Hollinger, J. O., Carrier Systems For Bone Morphogenetic Proteins. Clinical Orthopaedics and Related Research. 367, Supp., 95-106, (1999).

Wolfe, M.W., Salkeld, S. L., Cook, S. D. Bone Morphogenic Proteins In The Treatment Of Non-Unions And Bone Defects: Historical Perspective And Current Knowledge. The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal, 12, 1-6, (1999).

Yuehuei, H. ve ark. Pre-Clinical İn Vivo Evaluation Of Orthopaedic Bioabsorbable Devices. Biomaterials, 21, 24, 2635-52, (2000).

1- Proje No :	<b>TBAG-2060 (101T041)</b>
2- İlgili Araştırma Grubu :	<b>TBAG</b>
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri :	<b>1 Eylül 2001- 1 Eylül 2003</b>
4- Projenin Adı :	<b>Zor Kaynayan Kemik Kırıklarının Tedavisine Yönelik Kemik Morfojenik Proteini İçeren Biyobozunur Polimerik Salım Sistemleri Tasarlanması</b>
5- Proje Yürüttücsü ve Yardımcı Araştırmacılar :	<b>Prof. Dr. Vasif Hasircı Prof. Dr. Feza Korkusuz Dr. Dilek Keskin Dr. Ayşen Tezcaner</b>
6- Projenin Yürüttüldüğü Kuruluş ve Adresi :	<b>ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Birimi, Ankara 06531</b>
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi :	
8- Özet (Abstract) :	<p style="text-align: center;"><b>ÖZET</b></p> <p>Kemik morfojenetik proteinler (KMP) kemik oluşumunu uyarıcı özellikleri nedeniyle çeşitli kemik hastalıkları üzerinde klinik araştırmaları yoğun bir şekilde sürmekte olan proteinlerdir. Kemik oluşumundaki güçlü etkileri nedeniyle tedavide lokal olarak sadece hasarlı kemik bölgelere uygulanması gerekmektedir. Bu amaçla son yıllarda KMP içeren değişik birçok polimer ilaç salım sistemi araştırılmıştır. Bu klinik ihtiyacı düşünerek KMP yüklü disk şeklinde çözülebilir Kollajen ve kondroitin sülfat içeren taşıyıcı bir sistem tasarlanmıştır. <i>In situ</i> salım deneyleri model olarak seçilen bir protein (floresan işaretli protein A) ile yapılmış</p>

ve bunların sonucunda çok yüksek salım hızı (hemen hemen bütün malzemenin 24 saatte salındığı) gözlenmiştir. Çözünebilir kollajenin yüksek su bağlanma kapasitesiyle açıklanabilen bu problem sistemin poli(L-laktit), (PLLA) and sükroz asetat izobutirat (SAIB) polimerlerinin karışımıyla kaplanması ile çözülmüştür. Böylece model ilaç için salım süresi 12 güne uzatılmıştır. Aynı sistemin KMP ile yapılan *in situ* salım deneyleri KMP ye özel ELISA kitleri ile yapılmış ve model ilaçtan daha yavaş salım ele edilmiştir. KMP salımları ilaçın yarısının 15 günde saldığını göstermiştir. Osteoblast hücreleri ile yapılan *in vitro* deneylerde 2  $\mu\text{g}$  KMP içeren impantların ALP enzim aktivitesinde anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

KMP salım sisteminin *in vivo* uygulamalarında kemikte hasarlı bölgede sabitleyebilmek ve aynı zamanda kemiğe destek sağlamak amacıyla Vicryl ameliyat iplikleriyle örülerek poli(L-laktit-ko-glikolit) (PLGA) ile fiber bağlama ile sabitlenmiş bir ağ hazırlanmıştır. Kemikteki iyileşme düzeyi iki zaman süreci (1 hafta ve 3 hafta) için değerlendirilmiştir. KMP taşıyıcı sistemin kemik oluşumunu indükleyici (osteoinductive) etkisi histolojik skorlama, x-ışınları (röntgen analizleri) ile değerlendirilmiştir. *In vitro* deneyler KMP yüklü PLLA-SAIB kaplanmış kollajen, kondroitin sülfat disklerinin iyi biyoyumluluk ve optimum osteojenik uyarıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Histoloji mikrograflarındaki 1 hafta sonundaki yapısal değişiklikler doza bağlı perostta kemikleşme göstermektedir. 3 hafta sonundaki histolojik bulgularda ise her iki dozda da (1 ve 2  $\mu\text{g}$ ) sonuçlar kabaca aynıdır.

## ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are osteoinductive proteins which are under intense clinical investigation for use in various bone related treatments. Owing to their high potential for new bone formation they require local application at the treatment site. For this purpose various polymeric delivery systems involving BMPs have been prepared in recent years. Focusing on this clinical need a disc shaped BMP carrier was designed using soluble collagen and chondroitin sulfate. *In situ* release studies were carried out with a model protein (FITC labeled Protein A) indicated a very high rate of release; system released most of its protein content within 24 h. This was expected from the high water binding property of the soluble collagen and the rate could be decreased by providing a poly(L-lactide), (PLLA) and sucrose

acetate isobutyrate (SAIB) based coat around the release system following BMP loading. It was thus possible to extend the release period to about 12 days for the model drug. *In situ* release of BMP from the same carriers as quantitated by an ELISA kit indicated an even slower kinetics with 50 % of the protein released in 15 days. *In vitro* studies involving osteoblasts and 2 µg rhBMP loaded implants revealed a significant difference in the ALP activities.

In order to be able to keep the BMP delivery system at the bone defect site and also to provide support and test the osteoconductive effect, a mesh knitted with Vicryl sutures and bonded with poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) was used in the *in vivo* applications. Two time periods, 1 and 3 weeks, were used to evaluate the healing process. Osteoinduction by the BMP carrier system was assessed by histology based bone scoring and X-ray examinations. PLLA/SAIB coated collagen discs containing BMP presented good biocompatibility and optimum osteogenic stimulation. Structural changes in histological micrographs at week 1 indicated dose-dependent periosteal ossification. At the end of week 3 histological findings with both BMP (1 and 2 µg) doses were almost the same.

9- Anahtar Kelimeler :

Kemik Morfojenik Proteini, Kollajen, kondroitin sülfat, polimerik ağ, kontrollü ilaç salımı, PLLA, SAIB

**Keywords:**

Bone Morphogenetic Protein, collagen, chondroitin sulphate, polymeric mesh, controlled drug delivery, PLLA, SAIB

10- Projede Yapılan Çalışmaların Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ);  
Makale yayına hazırlanmış olup sunulmak üzeredir.

11- Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu : Makaleler yayınlanıncaya kadar **GİZLİ**

Gizli

Gizli Değil