

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Doktora Tezi

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN VE KOMPOZİT İSKELELERİN
KULLANIMIYLA KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ**

Aysel KOÇ

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA

2008

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ve KOMPOZİT İSKELELERİN KULLANIMIYLA KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez çalışmasında, poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve kitosan/hidroksiapatit (K/HA) kompozit iskeleler sırasıyla partikül uzaklaştırma ve dondurarak kurutma yöntemleriyle hazırlandı. PLGA iskeleler malzeme yüzeyinde apatit oluşumu sağlamak için yapay vücut sıvısında inkübe edildi. K/HA iskelelerin bir bölümü insan vasküler endotelial büyüme faktörü (hVEGF) ve yeşil floresan protein (GFP) sentezleyen adenoviral vektörle transfekte edildi. Mezenkimal kök hücreler Wistar sıçanların kemik iliğinden izole edilerek kültüre alınıp çoğaltıldıktan sonra mineralize PLGA iskelelere statik ve dinamik kültür şartlarında tohumlandı. Çalışmada, fare MC3T3-E1 hücre dizisi ve insan osteoblast hücreleri de hücre kaynağı olarak kullanıldı. MC3T3-E1 hücreleri saf K/HA iskelelere tohumlanırken, hOB hücreleri saf ve transfekte edilmiş K/HA iskelelere tohumlandı. Hücre tohumlanmış iskelelerin 4 hafta boyunca kültürü sürdürüldü. Hücre canlılığı MTT testiyle, osteoblastik fenotip ise alkalen fosfataz aktivitesi, immünohistokimyasal boyamalar ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile belirlendi. hOB hücrelerinin K/HA iskele içerisindeki dağılımını ve GFP salınımını belirlemek için konfokal lazer mikroskopisi (KLM) kullanıldı. Transfekte edilen K/HA yüzeyindeki hOB hücreleri tarafından üretilen hVEGF, ELISA yöntemiyle belirlendi. SEM bulguları iskelelerin (PLGA ve K/HA) yüksek porözitede ve birbirleriyle bağlantılı gözeneklere sahip olduğunu gösterdi. Histolojik ve SEM bulguları hücrelerin (MKH'lerin, MC3T3-E1 ve hOB hücrelerinin) iskelelerin gözeneklerine yayıldığını ve çoğaldığını gösterdi. İmmünohistokimya çalışmaları hücre tohumlanmış iskelelerin yüksek seviyede osteojenik markör proteinlerini sentezlediğini ortaya koydu. KLM hOB hücrelerinin iskele içerisine homojen dağıldığını ve hücre proliferasyonunun inkübasyon süresiyle orantılı arttığını gösterdi. İskele yüzeyindeki hücreler tarafından üretilen hVEGF'un, uygulanan viral dozla paralellik gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar, PLGA ve K/HA (saf ve genle aktive edilmiş) iskelelerin kemik doku mühendisliği için potansiyel taşıdıklarını gösterdi.

Şubat 2008, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, Gen terapisi, Mezenkimal kök hücre, MC3T3-E1, Osteoblast, Genle uyarılmış matriks, VEGF, Kompozit iskele, Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit), Kitosan, Hidroksiapatit, Biyoreaktör.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

BONE TISSUE ENGINEERING USING MESENCHYMAL STEM CELLS and COMPOSITE SCAFFOLDS

In this study, poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and chitosan/hydroxyapatite (C/HA) composite scaffolds were prepared by the particulate leaching and freeze-drying methods, respectively. PLGA scaffolds were incubated in simulated body fluid for apatite growth on the material. Some of the C/HA scaffolds were transfected with adenoviral vector encoding human vascular endothelial growth factor (hVEGF) and green fluorescent protein (GFP). Mesenchymal stem cells isolated from bone marrow of Wistar rats were cultured, expanded and seeded on mineralized PLGA scaffolds under static and dynamic culture conditions. In the study, mouse MC3T3-E1 cells and human osteoblasts (hOBs) were also used as cell source. While MC3T3-E1 cells were seeded on pure C/HA scaffolds, hOBs were seeded on pure and transfected C/HA scaffolds. The cell seeded scaffolds were cultured for upto 4 weeks. Cell viability was investigated by the MTT assay, differentiation of cells into osteoblastic phenotype were determined by alkaline phosphatase activity, immunohistochemical staining, and scanning electronic microscopy (SEM). Confocal laser microscopy (CLM) was used to investigate the distribution of hOBs inside the C/HA scaffolds and to visualize the GFP expression inside the cells. The hVEGF produced by hOBs on transfected C/HA scaffolds was measured using the ELISA method. SEM observations revealed that the scaffolds (PLGA and C/HA) had a highly porous structure, and were well-interconnected. Histological and SEM observations showed that cells (MSCs, MC3T3-E1 cells and hOBs) were widespread and had proliferated extensively within the pores of the scaffolds. Immunohistochemistry studies revealed that the cells-seeded scaffolds expressed higher levels of osteogenic marker proteins. CLM results confirmed that the distribution of hOBs inside sponges was quite uniform and the proliferation of the cells had gradually increased by incubation time. The hVEGF produced by the cells on the scaffolds increased with the increase in viral dose. Based on the results, it can be concluded that mineralized PLGA and C/HA (pure and gene-activated) scaffolds have potential in bone tissue engineering.

February 2008, 105 pages

Key Words: Bone tissue engineering, Gene therapy, Mesenchymal stem cell, MC3T3-E1, Osteoblast, Gene activated matrix, VEGF, Composite scaffold, Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), Chitosan, Hydroxyapatite, Bioreactor.

TEŞEKKÜR

"Kimse tek başına başaramaz sana yardımcı olanlara minnet duy! "

Bu çalışmanın doktora tezi olarak seçilmesinde ve araştırmaların yürütülmesi sırasında değerli bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Murat Elçin'e şükranlarımı sunarım.

Araştırmaların mikroskobiye dayalı bölümlerinin yürütülmesinde olduğu kadar diğer her konuda manevi desteğini gördüğüm değerli hocam Doç. A. Eser Elçin'e teşekkürlerimi sunarım.

Almanya'da yürütülen çalışmalar sırasında yardımlarını gördüğüm sayın Doç. Dr. Günther Finkenzeller'e ve Beate vom Hövel'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez süresince fedakarlıklar göstererek beni destekleyen aileme ve manevi desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aysel KOÇ

Ankara, Şubat 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 Kemik Dokusu	5
2.1.1 Kemik	5
2.1.2 Kemik hücreleri.....	5
2.1.2.1 Osteojenik hücreler	6
2.1.2.2 Osteoblastlar.....	6
2.1.2.3 Osteositler	7
2.1.2.4 Osteoklastlar.....	8
2.2 Kemik Matriksi	9
2.3 Periosteum ve Endosteum.....	10
2.3.1 Periosteum	10
2.3.2 Endosteum	10
2.4 Kemik Tipleri	11
2.4.1 Primer kemik dokusu.....	11
2.4.2 Sekonder kemik dokusu	11
2.5 Kemik Gelişimi.....	13
2.5.1 İntramembranöz kemikleşme	13
2.5.2 Endokondral kemikleşme	13
3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	16
3.1 Kemik Doku Mühendisliği.....	17
3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Destek Malzemeler	18
3.3 Kemik Doku Mühendisliği Çalışmalarında Kullanılan Bazı Biyopolimerlerin, Biyoseramiklerin ve Kompozitlerin Özellikleri	21

3.3.1 Biyopolimerler	22
3.3.1.1 Doğal polimerler	22
3.3.1.1.1. Kitosan.....	23
3.3.1.1.2 Kollajen.....	25
3.3.1.2 Sentetik biyopolimerler	26
3.3.1.2.1 Poli (α-hidroksi asitler)	26
3.3.1.2.1.1 Poli (glikolik asit) (PGA)	27
3.3.1.2.1.2 Poli (L-laktik asit) (PLA).....	27
3.3.1.2.1.3 Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	27
3.3.2 Biyoseramikler	28
3.3.2.1 Hidroksiapatit (HA)	28
3.3.3 Kompozit malzemeler	29
3.3.3.1 Malzeme yüzeylerinin mineralizasyonu	30
3.4 İskele Hazırlama Yöntemleri	31
3.4.1 Partikül uzaklaştırma (<i>Solvent casting / Particle leaching</i>) yöntemi.....	31
3.4.2 Dondurarak kurutma (<i>Freeze-Drying</i>) yöntemi.....	32
3.4.3 Lif bağlama (<i>Fiber bonding</i>) yöntemi	33
3.4.4 Gazla köpüklendirme (<i>Gas foaming</i>) yöntemi.....	33
3. 5 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri	34
3.6 Gen Terapisi	36
3.6.1 Genlerin vücuda aktarılma yöntemleri	36
3.6.2 Gen tedavisinde viral vektörler	39
3.6.2.1 Adenovirüsler	39
3.6.2.2 Retrovirüsler	41
3.6.2.3 Herpesvirüsler	42
3.6.3 Gen tedavisinde viral olmayan vektörler	42
3.7 Hücre Kaynakları	43
3.7.1 Kök hücre kaynakları	43
3.7.1.1 Embriyonik kök hücreler	43
3.7.1.2 Erişkin kök hücreler.....	45
3.7.1.2.1 Erişkin kök hücre tipleri	46
3.7.2 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan diğer hücre kaynakları.....	48
3.8 Hücre Kültürü Yöntemleri	49

3.8.1 Döner kap (<i>Spinner flask</i>) reaktörler.....	49
3.8.2 Mikrotasıyıcı-destekli reaktörler	50
3.8.3 Perfüzyon kültürler	50
3.8.4 Döner-duvarlı biyoreaktörler (<i>Rotating wall vessels</i> , RWVs)	51
3.9 Anjiyogenez	52
4. MATERYAL ve YÖNTEM	57
4.1 Madde ve Malzeme	57
4.2 İskelelerin Hazırlanması	58
4.2.1 Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) iskelelerin hazırlanması	58
4.2.2 PLGA iskelelerin mineralizasyonu	58
4.2.3 Kitosan/Hidroksiapatit (K/HA) iskelelerin hazırlanması	59
4.2.4 Kitosan/Hidroksiapatit iskelelerin Ad-GFP-VEGF ile aktivasyonu	59
4.3 Hücre Kaynakları	60
4.3.1 Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve kültürü	60
4.3.2 MC3T3-E1 ve hOBs hücrelerinin kültürü	60
4.4 Polimer İskelelerin Sterilizasyonu ve Kültür İçin Hazırlanmaları	61
4.5 Hücrelerin İskelelere Tohumlanması	61
4.5.1 Statik tohumlama	62
4.5.2 Dinamik tohumlama	62
4.6 Histoloji (Işık Mikroskopisi)	63
4.6.1 Hematoksilin ve Eosin boyaması (H&E)	63
4.6.2 Alizarin kırmızısı (AR-S)	64
4.6.3 Von Kossa boyaması	64
4.7 İmmünohistokimya	65
4.8 SEM	65
4.9 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] Testi	66
4.10 Konfokal Lazer Mikroskopisi (<i>Confocal laser scanning microscopy</i> , KLM)...	66
4.11 VEGF Salımı	66
5. BULGULAR.....	67
5.1 Mineralize PLGA İskelelerle İlgili Araştırma Bulguları (1.Grup).....	67
5.1.1 Faz kontrast mikroskobu bulguları	67
5.1.2 SEM bulguları	67

5.1.3 MTT bulguları.....	70
5.1.4 İmmünohistokimya bulguları	70
5.1.5 Kütle artışı bulguları.....	71
5.1.6 FTIR bulguları	72
5.1.7 Alizarin kırmızısı bulguları	73
5.2. Kitosan/Hidroksiapatit İskeleleri İçin Araştırma Bulguları	74
5.2.1 Faz kontrast mikroskobu bulguları	74
5.2.2 SEM bulguları	75
5.2.3 Histoloji bulguları	77
5.2.4 Von Kossa bulguları.....	78
5.2.5 ALP bulguları.....	79
5.2.6 İmmünohistokimya bulguları	80
5.2.7 KLM bulguları	82
5.2.8 VEGF salım bulguları	85
6. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	87
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	104

SİMGELER DİZİNİ

ECM	Ekstraselüler matriks
K	Kitosan
PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Poli(L-laktik asit)
PLGA	Poli(Laktik-ko-glikolik asit)
HA	Hidroksiapatit
SBF	Yapay vücut sıvısı (<i>Simulated Body Fluid</i>)
IGF	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
TGF β	Dönüştürücü (<i>Transforming</i>) büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik protein
EKH	Embriyonik kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
hOB	İnsan osteoblastı
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
α -MEM	<i>Modified Eagle's Medium</i>
K/HA	Kitosan/Hidroksiapatit
Ad-GFP-VEGF	VEGF ve GFP sentezleyen viral vektör
KLM	Konfokal Lazer Mikroskopisi
H&E	Hematoksilin ve Eosin
AR-S	Alizarin kırmızısı
MTT	Mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi
GFP	Yeşil floresan protein (<i>Green Fluorescent protein</i>)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NCPs	Kollajen yapıda olmayan proteinler
AR-S	Alizarin kırmızısı
RCCS	<i>Rotary Cell Culture System</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Osteojenik hücrenin genel görünümü	6
Şekil 2.2 Osteositlerin ve osteoblastların genel görünümü	7
Şekil 2.3 Osteositlerin ve kanakülilerin genel görünümü	8
Şekil 2.4 Osteoklastların genel görünümü	9
Şekil 2.5 Havers sisteminin genel görünüşü	12
Şekil 2.6 Endokondral kemikleşmenin mekanizması	15
Şekil 3.1 Üç boyutlu iskele yapının bilgisayar ortamında genel görünüşü	18
Şekil 3.2 Hücrelerin 3-B iskele malzemelere ihtiyaç duymalarının şematik olarak gösterimi	19
Şekil 3.3 İskele malzemenin genel görünüşü	20
Şekil 3.4 Kitosanın formülü	23
Şekil 3.5 Doku mühendisliğinde değişik kompozisyonlarda kullanılan kitosan iskeleler	24
Şekil 3.6 Kollajenin yapısı	25
Şekil 3.7 PGA, PLA ve PLGA polimerlerinin formülleri	27
Şekil 3.8 NaCl kullanılarak hazırlanan iskele yapının SEM fotoğrafları	32
Şekil 3.9 Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan iskelenin SEM fotoğrafları	33
Şekil 3.10 PGA'dan hazırlanan lifin genel görünümü	33
Şekil 3.11 Gazla köpüklendirme yöntemi ile iskele yapıların hazırlanması	34
Şekil 3.12 Genin vektör vasıtasıyla doğrudan enjeksiyonu	37
Şekil 3.13 Gen terapisinde kullanılan yaklaşımlar	38
Şekil 3.14 Adenovirüslerin genel yapısı	40
Şekil 3.15 Adenovirüslerin hücre içerisine girişlerinin şematik gösterimi	40
Şekil 3.16 Retrovirüslerin genel yapısı	41
Şekil 3.17 Herpesvirüslerin genel yapısı	42
Şekil. 3.18 Blastokist aşamasına ulaşmış bir embriyo	44
Şekil 3.19 Pluripotent kök hücrelerin çeşitli vücut hücrelerine dönüşümlerinin şematik gösterimi	44
Şekil 3.20 Multipotent kök hücrelerin çeşitli vücut hücrelerine dönüşümlerinin şematik gösterimi	46

Şekil 3.21 Kemik iliği hücrelerinin çeşitli vücut hücrelerine dönüşümlerinin şematik gösterimi	47
Şekil 3.22 Döner kap reaktörlerin genel görünümü.....	50
Şekil 3.23 Perfüzyon kültür kapının genel görünümü	50
Şekil 3.24 Döner duvarlı biyoreaktör sistemlerinin genel görünümü.....	51
Şekil 3.25 Hücrelerin iskele yüzeyindeki davranışları.....	53
Şekil 3.26 VEGF'nin yapısı	54
Şekil 3.27 VEGF ligandlarının reseptörlerle etkileşimlerinin şematik gösterimi	55
Şekil 3.28 VEGF'nin polimer matriksten salımını	56
Şekil 3.29 VEGF kullanımı ile iskelet malzemedeki damar oluşumu	56
Şekil 4.1 İskele yüzeylerine hücre tohumlama yöntemlerinin şematik gösterimi.....	61
Şekil 4.2 İçerisinde mezenkimal hücre tohumlanmış mineralize PLGA iskelelerin kültürünün yürütüldüğü STLV biyoreaktörünün görünümü	63
Şekil 5.1 Mezenkimal kök hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüsü.....	67
Şekil 5.2 PLGA iskelerin SEM mikrografları	68
Şekil 5.3 PLGA yüzeyinde SBF ile inkübasyon sonrası oluşan mineral plakların SEM görüntüleri.....	69
Şekil 5.4 Mezenkimal kök hücre tohumlanmış mineralize PLGA iskelelerinin SEM görüntüleri.....	69
Şekil 5.5 Mezenkimal hücre tohumlanmış iskelelerin 14. gündeki MTT boyamaları ...	70
Şekil 5.6 Mezenkimal kök hücre tohumlanmış iskelelerin 28. gündeki Anti-Osteopontin antikor boyamaları.	71
Şekil 5.7 SBF içerisinde mineralize edilen PLGA iskelelerinde zamana bağlı kütle artışı	71
Şekil 5.8 Mineralize PLGA iskelelerin SBF ile inkübasyon sonrası elde edilen FTIR spektrumları	72
Şekil 5.9 Mineralize iskelerin AR-S boyamaları	73
Şekil 5.10 MC3T3-E1 hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüsü	74
Şekil 5.11 A. hOB hücrelerin 2.gündeki faz kontrast mikroskobu; B,C. Transfekte edilen hOB hücrelerinin 2.gündeki faz kontrast mikroskobu ve floresan mikroskobu görüntüsü	75
Şekil 5.12 K/HA iskelelerin SEM mikrografları.....	76

Şekil 5.13 hOB hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin SEM mikrografları	76
Şekil 5.14 MC3T3-E1 hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin SEM mikrografları....	76
Şekil 5.15 hOB hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin günlerdeki ışık ve floresan mikroskobu altındaki H&E boyamaları.....	77
Şekil 5.16 MC3T3-E1 tohumlanmış K/HA iskelelerin H&E boyamaları	78
Şekil 5.17 MC3T3-E1 tohumlanmış K/HA iskelelerin 21. günlerdeki von Kossa boyaması	79
Şekil 5.18 K/HA iskele yüzeyine hOB hücrelerinin ALP boyamaları	80
Şekil 5.19 hOB hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin Anti-osteonektin antikoru boyamaları.....	81
Şekil 5.20 MC3T3-E1 hücreleri tohumlanmış K/HA Anti-osteokalsin antikoru boyamaları	81
Şekil 5.21 hOB hücreleri tohumlanmış iskelelerin 7. günlerdeki Anti-VEGF antikoru boyamaları.....	82
Şekil 5.22 Farklı viral dozlarla aktive edilmiş K/HA iskele yüzeylerine tohumlanmış hücrelerin konfokal lazer mikroskopunda çekilmiş GFP salım görüntüleri	83
Şekil 5.23 Farklı zaman noktalarında çekilmiş iskele ve hOB-iskele yapılarının konfokal lazer mikroskobu görüntüleri.....	84
Şekil 5.24 Farklı viral dozlarla aktive edilmiş K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerden ortama salınan hVEGF seviyeleri	85
Şekil 5.25 1000 MOI ile aktive edilmiş K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerden besiyerine 13. gün boyunca salınan hVEGF miktarları.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Çalışmada kullanılan deneysel gruplar.....	3
Çizelge 3.1 İskelelerin hazırlanmasında kullanılan biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması.....	19
Çizelge 3.2 Kitosanın kimyasal ve biyolojik özellikleri	24
Çizelge 3.3 Kan plazması ve SBF'nin iyon derişimlerinin kıyaslanması.....	30
Çizelge 3.4 Yapay vücut sıvısı bileşimi.....	30
Çizelge 3.5 VEGF ailesinin üyeleri	55
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan deneysel gruplar.....	62

1. GİRİŞ

Tıp teknolojilerinde gözlenen büyük gelişmelere rağmen, çeşitli klinik uygulamalar için gerekli olan doku veya organ kaynağı sıkıntısı henüz çözümlenememiştir. İnsan vücudunda ortaya çıkabilen eksiklik ve hasarların tedavisinde, yerine göre otogreftler (hastanın kendisinden temin edilen), allogreftler (diğer insanlardan temin edilen), zenogreftler (hayvanlardan temin edilen) veya implant biyomalzemeler kullanılmaktadır (Thomson *et al.* 1995).

Otogreft kullanımı, tedavilerde tercih edilen yol olmakla beraber, donör bölgede gözlenen kısmi doku ölümü, kullanılabilir donör dokunun çoğunlukla gerekenden az oluşu, cerrahi işlemlerin acı verici, zaman alıcı ve pahalı olması allogreftlere olan yönelimi arttırmaktadır (Duckeyne and Qui 1999). Bunun yanısıra, genetik farklılıklardan, hastalık bulaşma riskinden ve yerleştirilen grefte karşı oluşabilen immün tepki reaksiyonu gibi nedenlerden dolayı allogreftlerin kullanımında da kısıtlamalar bulunmaktadır (Cerroni *et al.* 2002). Zenogreftlerin kullanımı ise, zoonosis riski ve ileri düzeyde immün tepki gibi nedenlerle çoğunlukla tercih edilmeyen bir seçenek olarak görülmektedir.

Yakın zamanlara kadar, hasar görmüş ya da fonksiyonunu yitirmiş doku ve organların yalnızca transplantasyonla veya tamamen yapay (polimer, metal veya seramik) implantlarla değiştirilmesi tercih edilmekteydi. Son yıllarda ise, yeni bir rejeneratif tedavi yaklaşımı olarak doku mühendisliği önem kazanmaya başlamaktadır (Langer *et al.* 2000). Bu yaklaşım, izole edilmiş memeli hücreleri ve bunları sentetik hücre-dışı matriks (ve geçici adhezyon yüzeyleri) olarak destekleyen çoğunlukla polimer yapıli makroporöz iskeleleler ve büyüme faktörleri kullanılarak yeni doku organoidlerinin geliştirilmesi olarak basitçe tarif edilebilir (Elçin 2003).

Kök hücreler, rejeneratif tıp uygulamaları için çok değerli bir hücre kaynağı olarak ortaya çıkmaktadır (Elçin 2004). Bunlar arasında, erişkin kökenli olan ve göreceli olarak daha kolay izolasyon ve ekspansiyon özelliğı taşıyan kemik iliğı mezenkimal

kök hücrelerinin (MKH), kemik doku mühendisliği için yüksek potansiyel taşıdığı son yıllarda yapılan araştırmalarla ortaya çıkmıştır. Bu hücre kaynağının, doğrudan hastadan (otolog) veya diğer insan donörlerden (allogreft) temin edilme imkanı bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin dışında kemik doku mühendisi çalışmalarda insan osteoblastları ve MC3T3-E1 hücreleri gibi osteojenik potansiyele sahip hücrelerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kemik doku mühendisliğinde önemli olan diğer parametre uygun malzemenin seçimi ve üretimidir. Bu çalışmada hücre iskelesi biyomalzemelerinin yapımında, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve kitosan polimerleri kullanıldı. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemelerin kemiğe bağlanabilmesi malzemenin kalsiyum fosfat içeriğiyle yakından ilişkilidir. Bu nedenle PLGA ve kitosan polimerlerinin mineralize formları kullanıldı. Bu amaçla partikül uzaklaştırma yöntemiyle hazırlanan PLGA iskeleler yapay vücut sıvısı olarak adlandırılan SBF (*Simulated Body Fluid*) içerisinde 28 gün boyunca inkübe edildi. Bu yöntemle PLGA iskele yüzeylerinde hidroksiapatit benzeri apatit oluşumu sağlanmış oldu. Hidroksiapatit içerikli kitosan iskeleler ise kitosan çözeltisine belirli oranda hidroksiapatit kristallerinin eklenmesi ile hazırlandı. Bu işlemin ardından kalıba dökülen örnek liyofilize edildi. İskelelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), FTIR ve kütle artışı gibi çeşitli yöntemlerle karakterize edildi.

Kemik doku mühendisliğinde karşılaşılan önemli problemlerden biri hücrelerin beslenmesi ve oksijenlenmesi için gerekli olan kan damarlarının matriks içerisinde oluşturulmasıdır. Kan damarlarının gelişimi hormonlar ve büyüme faktörleri ile ilişkilidir. Doku mühendisliği çalışmalarında bu faktörlerin direkt kullanımı, faktörlerin enjekte edildiği bölgeden hızlı difüzyonları sebebiyle sınırlı olmaktadır. Büyüme faktörlerinin etkinliği artırmak için son yıllarda gen terapisi yöntemleri kullanılmaktadır. DNA'nın doku mühendisliği matriksi ile birleştirilmesi, ilgili genin matriksten kontrollü salımını çok sayıda hücrenin enfekte olmasına ve ilgili proteinin

doku gelişimi sağlayacak miktarda sentezlenmesine yol açmaktadır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) damar oluşumunda (anjiyogenez) ve kemik oluşumunda görev alan bir büyüme faktörüdür. Bu çalışmada iskele içerisinde damar oluşumunu sağlamak için VEGF sentezleyen adenoviral vektör kullanılmıştır. Bu amaçla adenoviralin fosfat tamponundaki çözeltisi bir grup K/HA iskele yüzeyine damlatıldı. İskelelerin liyofilizasyonu ile adenoviral vektörle aktive edilmiş iskeleler hazırlanmış oldu.

Hazırlanan 3 farklı iskele (mineralize PLGA, saf ve aktive edilmiş K/HA iskeleler) 3 farklı hücre kaynağı olan (i) sıçan kemik iliği-mezenkimal kök hücreleri (MKH), (ii) insan osteoblastları (hOB) ve (iii) MC3T3-E1 hücre dizisi için destek materyali olarak kullanıldı. Çalışma toplam 4 farklı grup üzerinden gerçekleştirildi (Çizelge 1).

Çizelge 1.1 Çalışmalarda kullanılan deneysel gruplar

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
İskele	Mineralize PLGA	K/HA	K/HA	Adenoviralle aktive edilmiş K/HA
Hücre	MKH	MC3T3-E1	hOB	hOB

1.Grup çalışmaları için Wistar sıçanların kemik iliğinden standart protokollere uygun olarak izole edilen mezenkimal kök hücreler hücre kültürü şartlarında (% 10 FBS, penisilin-streptomisin, dekzametazon ve sodyumgliserofosfat içeren DMEM kültür ortamında) çoğaltıldıktan sonra mineralize PLGA iskelelere tohumlandı. Tohumlama işleminden sonra, yeni kemik dokusu oluşturmak amacıyla iskele malzemeler osteojenik indüksiyonuna yol açan vasat katkılarının yardımıyla, statik ve dinamik (biyoreaktör) koşullar altında kültüre edildi. Statik ve dinamik ortamlardan belirli zaman noktalarında alınan örnekler histolojik (Hematoksilin & Eosin (H&E), Alizarin kırmızısı boyaması gibi), immünohistokimyasal (Anti-osteopontin) yöntemlerle ve

taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenerek yeni kemik dokusu oluşumu karakterize edildi.

2. grup çalışmada osteojenik indüksiyonlu α -MEM içerisinde çoğaltılan MC3T3-E1 hücreleri K/HA iskelelere tohumlandıktan sonra statik ortamda kültüre edildiler. Belirli zaman noktalarında alınan örnekler histolojik (H&E, von Kossa boyaması gibi), immünohistokimyasal (Anti-osteopontin, Anti-osteokalsin) yöntemlerle ve taramalı elektron mikroskobu ile incelenerek yeni kemik dokusu oluşumu karakterize edildi.

3. grup ve 4. grup çalışmalarda DMEM-199 içerisinde kültüre edilen insan osteoblast hücreleri sırasıyla saf K/HA ve vasküler endotelyel büyüme faktörü (VEGF) sentezleyen adenoviral vektörle aktive edilmiş K/HA iskelelere tohumlandı. Belirli zaman noktalarında alınan örnekler histolojik (H&E, alkalen fosfataz), immünohistokimyasal (Anti-osteopontin) yöntemlerle, taramalı elektron mikroskobu ve konfokal lazer mikroskobu ile incelenerek yeni kemik dokusu oluşumu karakterize edildi. Aktive edilmiş iskele üzerine tohumlanmış hücrelerden ortama salınan VEGF miktarı VEGF ELISA yöntemi ile belirlendi.

Elde edilen sonuçlar, kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, MC3T3-E1 hücreleri ve insan osteoblast hücrelerinin üç-boyutlu mineralize PLGA ve K/HA iskele yüzeylerinde statik ve/veya dinamik biyoreaktör kültür şartları altında, osteojenik yönlendirici moleküller ve/veya büyüme faktörlerinin varlığında yeni kemik dokusu oluşturduğunu kanıtlamıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kemik Dokusu

2.1.1 Kemik

Kemik; hidroksiapatit kristallerinden, osteoblastlardan, osteositlerden, osteoklastlardan, hematopoetik hücrelerden, kollajen liflerden, kan damarlarından ve sinirlerden oluşmuş insan vücudunun en sert dokularından birisidir (Copenhaver *et al.* 1978). Hücrelerden, liflerden ve temel maddeden oluşan bağ dokularına benzer, ancak kemikte hücre dışı matriks kalsifiye olmuştur.

Organizmada kemik dokunun çeşitli fonksiyonları vardır:

- 1) Vücuta mekanik dayanıklılık sağlar.
- 2) Yumuşak dokulardan meydana gelmiş yapıları destekler.
- 3) Kalsiyum-fosfat dengesini sağlar.
- 4) Hematopoez için uygun çevreyi sağlar.

Kemik, kendini yenileme ve onarma yeteneğine sahip bir dokudur. Yaşantımız boyunca kemiklerin özelliklerini sürdürebilmesi için yıpranmış kemiklerin yıkılması ve bunların yerine yeni kemiklerin oluşması gerekmektedir. Kemik oluşumu ve yıkımı oldukça dengeli bir biçimde gerçekleşmektedir. Çocukluk ve erişkinliğin başlangıcında kemikler uzamaya, ağırlaşmaya ve yoğunlaşmaya başlar. Kemik yoğunluğu 20-25 yaşına gelindiğinde maksimum değerine ulaşır. Belirli bir yaştan sonra kemik yoğunluğu azalmaya başlar. Bayanlar için bu yaş sınırı daha düşüktür.

2.1.2 Kemik hücreleri

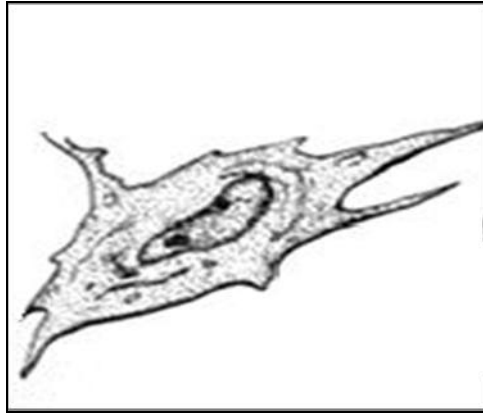
Kemik gelişiminde 4 tip hücre vardır:

- 1) Osteojenik hücre
- 2) Osteoblast

- 3) Osteosit
- 4) Osteoklast

2.1.2.1 Osteojenik hücreler

Osteojenik hücreler mezenkimal kökenli hücrelerdir. Düz uzunlamasına bir çekirdeğe, yaygın bir sitoplazmaya sahip olan hücrelerdir (Şekil 2.1). Periosteumun iç hücresel tabakalarında ve endosteumda bulunur. Kemik büyümesi esnasında aktif hale geçerler.



Şekil 2.1 Osteojenik hücrenin genel görünümü

2.1.2.2 Osteoblastlar

Kemik matriksinin organik kısımlarının sentezinden sorumlu olan osteojenik kökenli hücrelerdir (tip-1 kollajen, proteoglikanlar, glikoproteinler gibi). Osteoblastlar kemik yüzeylerinde epitel hücreleri andıracak şekilde yan yana dizilirler (Şekil 2.2). Çok sayıda endoplazmik retikuluma ve golgi kompleksine sahiptirler.

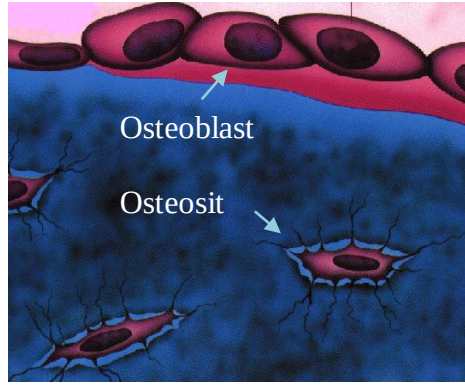
Osteoblastların olgunlaşma evreleri şu şekildedir:

Preosteoblastlar → Osteoblast → Osteosit

Preosteoblastlar, osteoblastların öncü hücresi olarak düşünülmektedir. Preosteoblastlar ve osteoblastlar morfolojik açıdan benzerlik gösterirler. Ancak preosteoblastlar olgun osteoblastlara göre bazı antijenleri daha az içerirler. Kemik üretiminde görev alan osteoblastlar proliferasyon yapmakta, şekilleri kübikten prizmatikçe kadar değişmekte ve yüksek oranda alkalen fosfataz aktivitesi göstermektedir. Sentez faaliyetleri azaldıkça yassılaşırlar. Alkalen fosfataz aktivitesi ortama fosfat iyonlarının (PO_4^{-3}) salınmasına ve bu fosfatların kalsiyuma (Ca^{+2}) bağlanmasını sağlar. Ancak alkalen fosfatazın fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Osteoblastlar; osteokalsin, kemik sialoprotein, osteopontin, belirli hormon reseptörleri, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi kemik matriksinin proteinlerini de sentezleyebilirler.

2.1.2.3 Osteositler

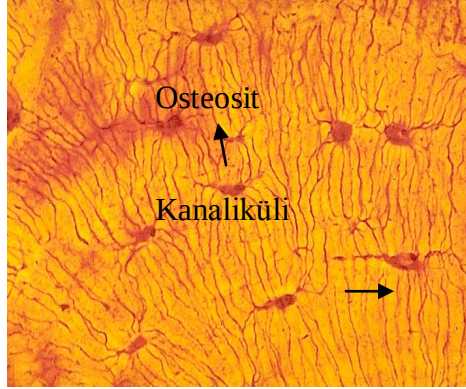
Kemik oluşumu tamamlandıktan sonra osteoblastların küçük bir kısmı yeni oluşan hücre-dışı matriks yapı içine geçerek osteositleri oluştururlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Osteositlerin ve osteoblastların genel görünümü (www.medes.fr)

Osteositler, osteoblastlardan daha küçük, yassı ve daha az sayıda sitoplazmik organelle sahiptir. Kemik matriksi içinde laküna denilen boşluklarda bulunurlar. Her lakünada sadece bir tane osteosit bulunur. Bu hücreler sitoplazmik uzantıları ile birbirine bağlanarak kanalikülileri oluştururlar. Metabolitler difüzyonla kalsifiye kemik matriksinden geçemezler. Osteositler ile kan kapillerleri arasındaki madde alışverişi ve iletişim bu kanalcıklar sayesinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.3). Kemikte bol miktarda

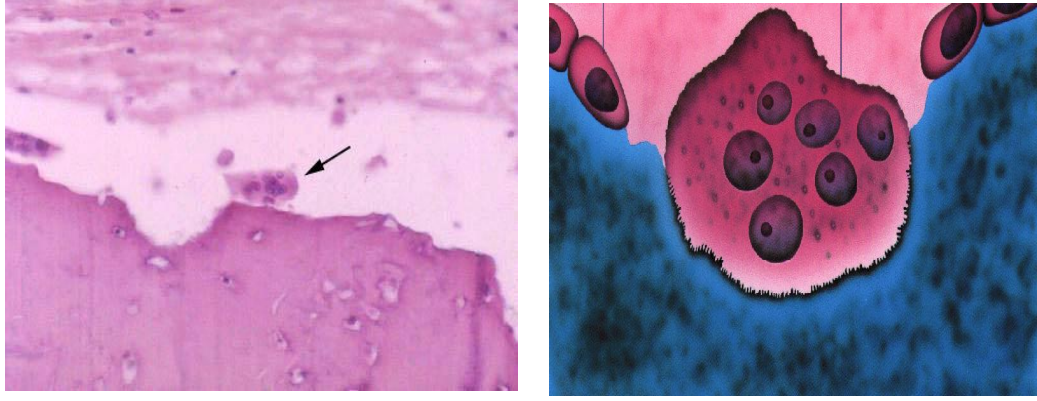
bulunan osteositlerin görevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Osteositler mekanik dirence karşı duyarlıdırlar ve bundan dolayı kemiğin yeniden şekillenmesinde görev aldığı düşünülmektedir.



Şekil 2.3 Osteositlerin ve kanakülilerin genel görünümü

2.1.2.4 Osteoklastlar

Kemik yıkımından sorumlu büyük, hareketli ve çok çekirdekli hücrelerdir (Şekil 2.4). Bir miktar mitokondriye, çok sayıda golgi aygıtına sahipken, endoplazmik retikulum ve ribozom içeriği çok düşüktür. Hematopoetik hücrelerin farklılaşmasıyla meydana gelen hücrelerdir. Genel olarak osteoklastların mononükleer çekirdekli öncü hücrelerden kaynaklandığı söylenebilir. Monosit-makrofajlar ile ortak kök hücreleri paylaşmaktadırlar. Osteoklast prekürsörlerinin olgun çok çekirdekli osteoklastlara dönüşebilmesinde hormonal ve lokal uyarıcılar gibi pek çok faktör ve kemik hücresi rol oynamaktadır.



Şekil 2.4 Osteoklastların genel görünümü (www.medes.fr)

2.2 Kemik Matriksi

Kemiğin % 70'i mineral (inorganik tuzlar), % 22'si protein (organik matriks) ve % 8'i sudur. İnorganik bileşimler kalsiyum ve fosfattan oluşan hidroksiapatit (HA)'tir. HA kristalleri, kollajen molekülleri tarafından oluşturulan boşluklarda birikmektedir. HA ile kollajen lifler arasındaki ilişki, kemiğin karakteristik sertliğinden ve dayanıklılığından sorumludur. HA'nın yüzeyindeki iyonlar hidrate edildiği için kristalin etrafı su ve iyonlardan oluşmuş bir tabaka ile kaplanmıştır. Hidratasyon kabuğu adı verilen bu tabaka vücut sıvıları ile kristal arasındaki iyon alışverişinin gerçekleşmesini sağlar.

Organik matriksin yaklaşık % 90'ını oluşturan kollajen osteoblastlar tarafından üretilir. Organizmada en fazla bulunan kollajen tip-I'dir ve bağ dokusunda geniş bir alan teşkil etmektedir. Tip-I'in dışında III-V-XI ve XIII'de bulunmaktadır.

Organik matriksin geriye kalan %10'luk kısmı kollajen yapıda olmayan proteinler olarak adlandırılır (NCPs). Bunlar bağlayıcı proteinler, proteoglukanlar, δ -karboksilat ve büyümede görev alan proteinlerdir.

2.3 Periosteum ve Endosteum

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. Dıştakine periosteum, içtekine endosteum denir.

2.3.1 Periosteum

Periosteumun dış fibröz ve iç hücresel tabaka olmak üzere 2 tabakadan oluşmuştur.

1) Dış fibröz tabaka: Kollajenli bağ dokusudur, pek çok kan damarı içerir. Kan damarlarının oluşturduğu dallanmalar sayesinde periosteumun iç tabakası volkman kanalları içerisine girmekte ve neticede damarlar ile osteojenik kanal arasındaki iletişim sağlanmış olur.

2) İç hücresel tabaka: Osteojenik potansiyele sahip osteoprojenitör hücreler içerir. Bu hücreler bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahiptirler. Osteoprogenitor hücreler konumları, yassı şekilleri, çok az miktarda granüler endoplazmik retikulum ve az gelişmiş golgi kompleksi ile tanınırlar. Demetler halinde periostal kollajen liflerden oluşan yapı Sharpey lifleri olarak adlandırılmaktadır. Bu lifler kemik matriksi içerisine girerek periosteumu sıkıca kemiğe bağlamaktadır.

2.3.2 Endosteum

Kemiğin içindeki bütün boşlukları örter. Tek tabakadan oluşan osteoprogenitör hücreler, bir miktar osteoblast ve bağ dokusu içerir. Endosteum perikondriuma kıyasla daha incedir.

Periosteumun ve endosteumun temel işlevleri; kemik dokusunun beslenebilmesi ve onarımı için gerekli olan osteoblastları sürekli olarak sağlamaktır.

2.4 Kemik Tipleri

Kemiğin mikroskopik araştırması 2 farklı tip olduğunu göstermiştir.

- 1) Primer, *olgunlaşmamış*, kemik
- 2) Sekonder, *olgun veya lameller*, kemik

2.4.1 Primer kemik dokusu

Primer kemik embriyolojik gelişim süresince, kırık ve diğer onarım olaylarında ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Primer kemik rastgele ve değişik yönlerde dağılmış ince kollajen lifleriyle tanınır. Primer kemik geçicidir ve yetişkinlerde yerini sekonder kemiğe bırakır. Kafadaki yassı eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe girdiği yerler gibi birkaç yer dışında, yerini sekonder kemiğe bırakır.

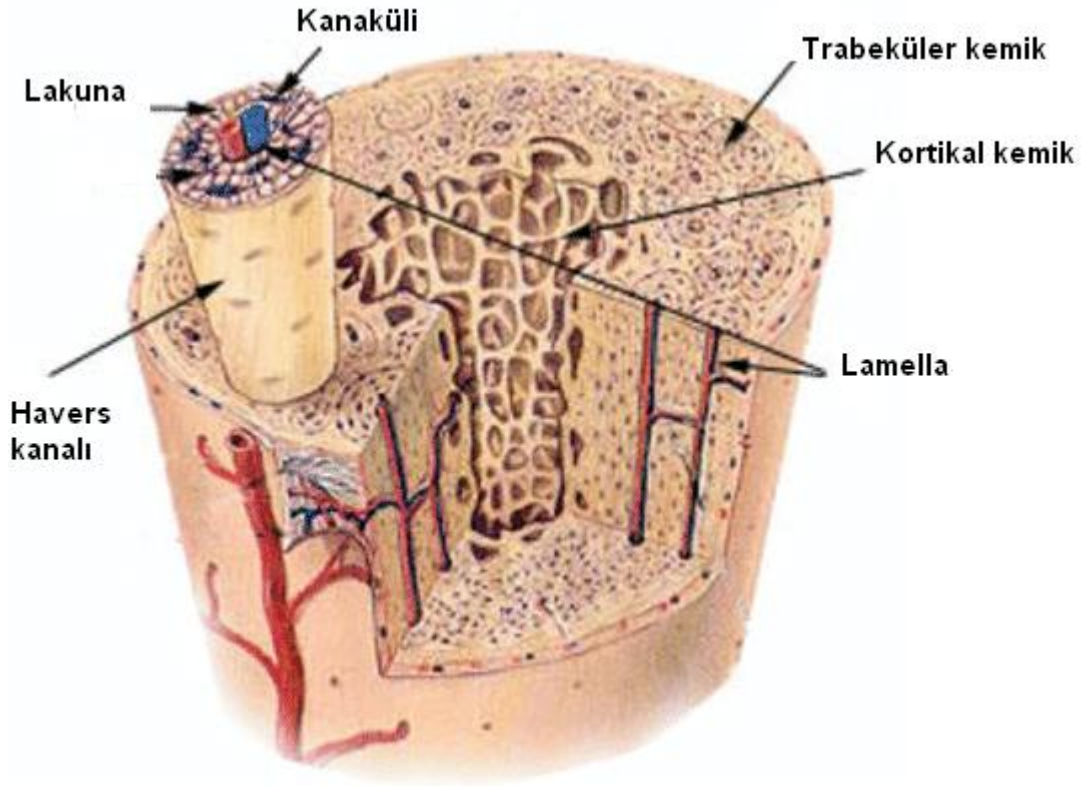
2.4.2 Sekonder kemik dokusu

Bu kemik dokusu lameller halinde organize olmuş kollajen lifleriyle karakterize edilirler. Kollajen lifler 3-7 µm kalınlığında birbirine paralel veya vasküler bir kanal etrafında dairesel olarak yerleşmiş lameller halinde düzenlenmiştir. Kan damarlarını, sinirleri, bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe havers sistemi veya osteon denir (Şekil 2.5). Osteositleri içeren lakunalar lameller arasında ve nadiren de içinde bulunur. Her havers sisteminin etrafı, birkaç kollajen lif ve mineralize amorf matriksten oluşan yapıştırıcı madde ile çevrelenir. Havers sisteminin ana fonksiyonu besin maddelerini sert kemiğe götürmektir (süngerimsi kemikte bu yapıya ihtiyaç yoktur). Her havers sistemi uzun sıkça dallanan ve diyafizin uzun eksenine paralel olan bir silindirdir. 4-20 dairesel lamelden oluşur. Endosteum ile kaplı her kanal içinde kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu bulunur. Havers kanalları yatay ya da oblik seyreden volkman kanalları aracılığı ile kemik iliği boşlukları, periosteum ve kendi aralarında iletişim kurmaktadır (Şekil

2.5). Volkman kanallarının dairesel lamelleri yoktur. Lamelleri delerek geçerler. Kemik dokusunda daha önce var olan kan damarlarının etrafına matriksin çökmesi ile meydana gelirler. Her sistemin lamelleri dıştan içe doğru birbiri ardına oluşur. Bu nedenle genç sistemlerin kanalları daha büyüktür.

Kompak kemikte lamellerdeki organizasyon 4 tiptir:

- 1) Dış dairesel lamella: Lamella periosteumun hemen altında bulunur ve diyafiz bölgesinin dışını oluşturur.
- 2) İç dairesel lamella: Tamamiyle kemik iliği boşluğunu çevrelemiştir.
- 3) Osteon lamelleri: Lameller osteonik kanallar etrafında düzenlenmiştir.
- 4) İntertisyel lamella: Üçgen ve düzensiz gruplar halinde birbirine paralel lamellerdir. Büyüme ve yeniden şekillenme sırasında yıkılan Havers sistemlerinden arta kalan lamellerdir.



Şekil 2.5 Havers sisteminin genel görünüşü (www.mcatpearls.com)

2.5 Kemik Gelişimi

Kemik osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile (intramembranöz kemikleşme) veya daha önce var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksin çöküşüyle (endokondral kemikleşme) şekillenmektedir.

2.5.1 İntramembranöz kemikleşme

Pek çok yassı kemiğin kemikleşmesinden sorumludur (frontal, parietal, maksilla, mandibula). Bu kemikleşme kısa kemiklerin kalınlaşmasında da rol oynamaktadır.

Mezenkimal doku yoğunlaşması ile oluşurlar. Mezenkimal yoğunlaşması ile kemikleşmenin başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Bir grup mezenkimal hücre osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar kemik matriksini oluştururlar ve kalsifikasyon başlar. Bazı osteoblastların etraflarının sarılmasıyla osteositler oluşur. Gelişmekte olan kemik adacıkları spikül (iğnecik) olarak adlandırılır. Kollajen fiberler gelişmekte olan spiküllerin içinde gelişigüzel bulunurlar (primer kemik). Spiküller aralarında kapillerler, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler bulunduran kaviteğin uzamış duvarlarının kesitleridir. Kemik spikülleri arasındaki bağ dokusuna, kan damarları ve daha fazla farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin girmesiyle kemik iliği hücreleri de meydana getirirler. Bağ dokusunun kemikleşmeye iştirak etmeyen bölümleri ise, intramembranöz kemiğin periosteum ve endosteumunu getirir.

2.5.2 Endokondral kemikleşme

Bu tip kemikleşme kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesinden sorumludur. Endokondral kemikleşmede, meydana getirilecek kemiğin şekli hiyalin kıkırdaktan oluşmuş küçük bir model içinde cereyan eder. Temel olarak 2 aşamadan ibaret çubuğuettir. İlk aşama kemik modelin kondrositlerin hipertrofisi ve harabiyetidir. Daha sonra osteojenik hücrelerin devreye girerek kalsifikasyonu başlatmalarıdır.

Ortaya çıkması gereken ilk kemik dokusu diyafizleri saran perikondriumun içindeki intramembranöz kemikleşme yoluyla olur. Böylece kıkırdığı saran perikondriumun iç kısmında kemik halkası adı verilen silindirik bir kemik tabakası meydana gelir. Yeni oluşan kemiği sardığı için perikondriuma artık periosteum denir. Yeni meydana gelen kemiksi halka besin maddelerinin difüzyonuna engel olacağı için kemik halkanın içinde kalan kondrositler dejenere oldukça, kıkırdak matriks ortadan kalkar ve kalsiyum çökmeye başlar ve kıkırdak matriksi kalsifiye olur.

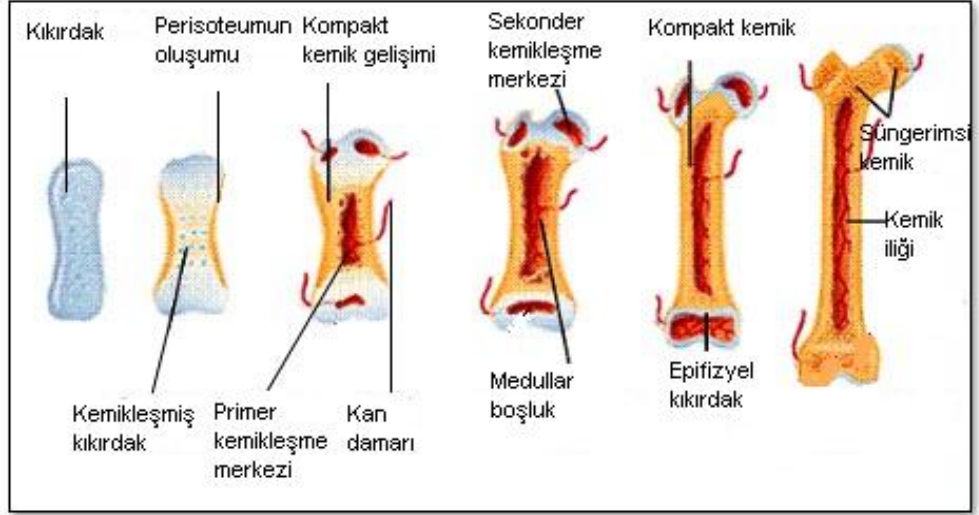
Periosteumundan kaynaklanan osteojenik tomurcuğunun kan damarları, osteoklastlar tarafından kemik halkada açılan deliklerden geçerek, kalsifiye olmuş kıkırdak matriks içine girer.

Kan damarlarının yanısıra osteoprojenitör hücrelerde bu alana girerek osteoblastları oluşturur. Osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matriks üzerinde, aralıksız bir tabaka oluşturularak kemik matriksinin sentezine başlarlar. Böylece primer kemik sentezi, kalsifiye olmuş kıkırdak artıkları üzerinde başlar. Diğer taraftan osteojenik tomurcuk aracılığıyla, kan dolaşımdaki kemik iliğinin esas hücreleri de yeni oluşan kemiğin içine getirilir. Kemik matriksi geliştikçe kalsifiye kıkırdak artıkları osteoklastlar tarafından ortadan kaldırılır. Uzunlamasına hızla büyüme, daha sonra kemik dokusunda oluşacak olan tüm diyafizleri tamamen kapladığında sona erer.

Osteoklastlar kemikleşme merkezi oluşumunun başlangıcından beri aktif haldedir ve resorbsiyonla kemiğin merkezindeki kemik iliği kavitesini meydana getirir. Bu kavite modelin kemikleşmesi tamamlanıncaya kadar epifizlere doğru büyür.

Epifizlerin ortasında sekonder kemikleşme merkezleri meydana gelir. Büyüme yönleri ışınsaldır. Ayrıca eklem kıkırdağında perikondrium olmadığı için burada kemik halkaya benzer bir yapı oluşmaz. Sekonder kemikleşme merkezinin oluşturduğu kemik dokusu epifizleri işgal ettiği zaman kıkırdak iki yerde hapsolür. Bunlardan biri hayat boyu kalıcı olan ve kemik yapımına iştirak etmeyen eklem kıkırdağı, diğeri ise epifizleri diyafizlere

bağlayan epifizyal kıkırdaktır. Epifizyal kıkırdağın büyümesi sona erdiğinde kemik uzaması da durur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Endokondral kemikleşmenin mekanizması (www.fire.bid.wvu.edu)

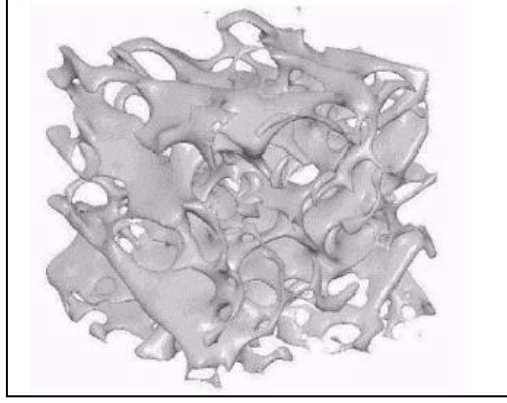
3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Son yıllarda ilerleyen teknolojik gelişmelere rağmen, dünyada milyonlarca insan organ transplantasyonu beklerken donör organ yetersizliği yüzünden hayatını kaybetmektedir (Thomson *et al.* 1995). Organ bağışıyla sağlanan organlar, en ileri ülkelerde bile bu hastaların ancak üçte birine yeterli olmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğu ise organ nakli sırasında hayatını kaybetmektedir. Organ bağışı ve uygun organın bulunması zorlukları karşısında, bilim adamları farklı organ kaynakları bulma yoluna gitmişlerdir. Vücut içerisindeki eksikliklerin ve hasarların tedavisinde otogreftler (hastanın kendisinden temin edilen), allogreftler (başka insanlardan temin edilen), zenogreftler (hayvandan temin edilen) ve implant malzemeler kullanılmaktadır. Otogreftlerin kullanımı tedavilerde tercih edilmektedir (Duckeyna ve Qui 1999). Ancak donör bölgede oluşacak acı, kısmi doku ölümü, donör bölgelerin sınırlı olması, cerrahi işlemlerin zaman alıcı ve pahalı olması allogreftlere yönelimi artırmıştır. Allogreftlerin kullanımları ise genetik farklılıklardan, hastalık bulaşma riskinden ve yerleştirilen grefte karşı oluşacak immün tepkiden dolayı kısıtlı olmaktadır (Cerroni *et al.* 2002). Genetik yapımızdaki % 98'lere varan benzerliğe karşın hayvanın organı vücut tarafından yabancı olarak algılanmakta ve ona karşı şiddetli bir savaş başlatılmaktadır. Bu da organın ölümüne neden olmaktadır. Organın reddi dışında, işlevsel bozukluklar da kişinin ölümüne neden olmaktadır. Nakledilen organın, insan organına benzer şekilde olması ve benzer kapasiteyle çalışması gerekmektedir. Bu bakımdan domuz organları insan organlarına en yakın olanıdır. Ancak bu hayvanlardan nakil yapmanın etik ve dini yönleri oldukça tartışmalıdır. Çok yakın zamana kadar, hasar görmüş ya da fonksiyonunu yitirmiş doku ve organların yalnızca transplantasyonla ya da tamamen yapay olan plastik ve metal implantlarla değiştirilebileceği düşünülmekteydi. Canlı hücrelerle doğal ya da sentetik polimerlerin birleşiminden oluşan ve biyoyapay organ olarak adlandırılan organların asla yapılamayacağı ve donör eksikliğinden kaynaklanan transplantasyon sorunlarının yalnızca hayvanlardan alınan organlarla giderilebileceği düşünülmekteydi. İşte bu noktada insan yapımı doku ve organların oluşturulması, yani 'Doku Mühendisliği' devreye girmektedir. Doku mühendisliği, organ ve doku transplantasyonlarında potansiyel alternatif çözüm olarak düşünülen interdisipliner bir bilim dalıdır (Langer *et al.* 2000). Doku mühendisliğinde ilk yaklaşım büyüme faktörü

gibi bir molekülün hasarlı doku veya organa direkt enjeksiyonudur. Bu molekül, hastanın kendi hücrelerinin istenilen tür hücreye dönüştürerek dokuyu yeniden üretir. İkinci yaklaşımda, çeşitli kaynaklardan (insan veya uygun hayvan) sağlanan hücrelerin uygun polimerik taşıyıcılardaki kapsülleri hazırlanarak vücuta verilir. Son yöntemdeyse, hastanın kendi hücreleri ya da uygun vericiden alınan hücreler, biyolojik ortamda bozunabilen polimerlerden hazırlanan üç boyutlu desteklere tutturulduktan sonra hasarlı bölgeye yerleştirilmektedir (Gümüşderelioğlu ve Türkoğlu, 2000). Hücreler çoğalıp yeni doku yapısını oluştururken polimer matriks parçalanır ve tamamen doğal ürün, yani doku elde edilir.

3.1 Kemik Doku Mühendisliği

Bazı kemik hastalıkları, tümörler ya da kırıklar büyük kemik hasarlarına yol açmaktadır. Kemik kaybı olan kısımların onarılması oldukça zordur. Kemik dokusu kendini yenileme yeteneğine sahip olsa da, oluşan büyük boşlukların doldurulması mümkün olmamaktadır. Örneğin tümör nedeniyle çıkartılan 10 santimetrelilik kemiğin yeniden oluşarak burayı doldurması olası değildir. İyi bir kemik iyileşmesi için, kemik uçlarının yakınlştırılması ve karşılıklı getirilmesi gerekmektedir. Çeşitli cerrahi tekniklerle kemik boyu uzatılarak boşluklar doldurulsa da, bu yöntem her hastada mümkün değildir. Amerika’da her yıl 1,5 milyondan fazla insan kemikle ilgili problemlerini çözebilmek amacıyla cerrahi işlemlere maruz kalmaktadır (Praemer *et al.* 1992). Geliştirilecek yapay kemikler sayesinde kemik kaybına yol açan kırıklar ya da hastalıklar tedavi edilebilir. Bilim adamları gerçek kemik dokusu oluşturmayı başardılar. Bu teknikte ilk olarak kemiğin iç ve dış yapısı kompüterize tomografi (CT) ya da magnetik rezonans (MRI) tetkikleri yardımıyla görüntülenmekte ve oluşan bu görüntüler bilgisayara aktarılmaktadır. Kemiğin dış yüzeyi oldukça pürüzsüz ve içi dolu gibi görünse de, ortası boş ve gövde kısmı iyi organize olmuş ince tabakalardan, yani lamellerden oluşur. Bu yapı, en ince hatlarına kadar bilgisayara yüklendikten sonra üç boyutlu polimer iskele oluşturulmaktadır (Şekil 3.1). Belirli bir zaman sonunda kendiliğinden erime özelliğine sahip olan bu iskele, oldukça sağlam yapıdadır. Vücuta yerleştirildikten sonra kemik hücreleriyle dolmaktadır. Vücut kendi kemik dokusunu oluşturdukça iskele yıkılarak ortamdan uzaklaşmaktadır.

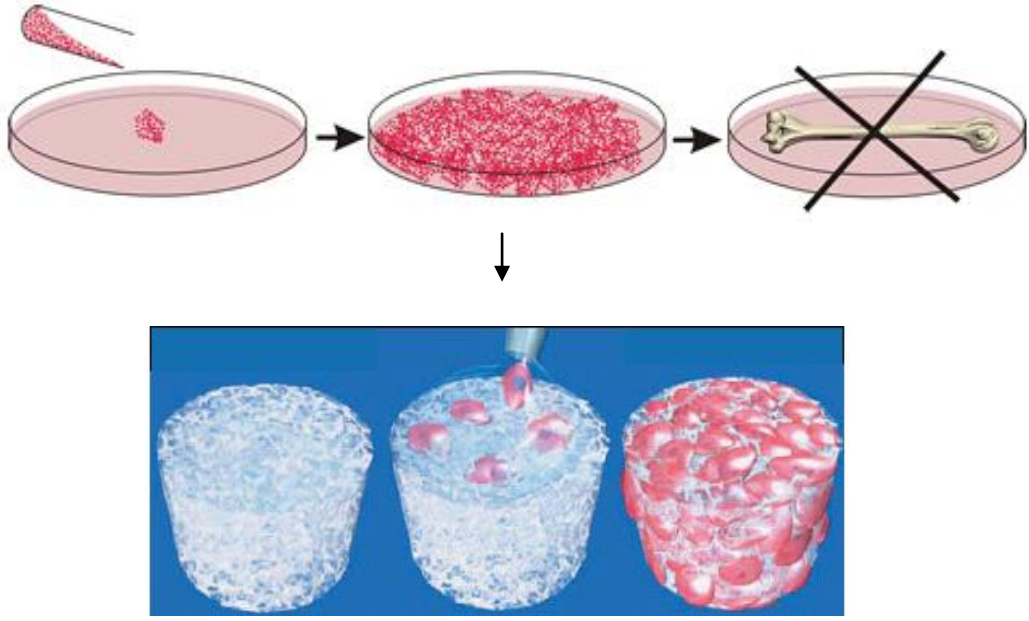


Şekil 3.1 Üç boyutlu iskele yapının bilgisayarlı tomografideki görünüşü

3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Destek Malzemeler

Doku mühendisliğinde önemli bir konu doku oluşumunu gerçekleştirecek yeni destek malzemelerinin geliştirilmesidir. Doku mühendisliği yaklaşımı ile bir dokunun onarımı ya da üretimi için o dokuyu oluşturan sağlıklı hücreler uygun bir malzeme üzerine tutturularak üretilmekte ve elde edilen ürün hastanın işlev görmesi istenilen doku bölgesine yerleştirilmektedir. Bu uygulama için çok az miktarda hücre yeterli olmaktadır, çünkü dokulardan izole edilen hücre türlerinin pek çoğu yapay besi ortamlarında çoğalabilme, diğer bir deyişle kültüre edilebilme özelliğine sahiptir. Fakat izole edilen hücrelerin tek başlarına yeni dokuyu oluşturmamaları düşünülmektedir. Çünkü çoğu organın hücreleri yüzeye bağımlıdır (anchorage-dependent, AD) ve çoğalmak için uygun bir çevre sağlayan destek malzemeye ihtiyaç duymaktadırlar (Şekil 3.2).

Yaygın olarak kullanılan destek malzemeler polimerik yapıda olup sentetik polimerler ve doğal polimerler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar (Çizelge 3.1).



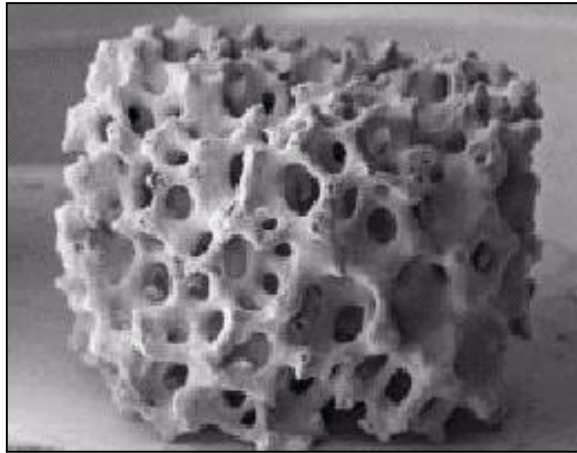
Şekil 3.2 Hücrelerin 3-B iskele malzemelere ihtiyaç duymalarının şematik olarak gösterimi

Çizelge 3.1 İskelelerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması

Sentetik polimerler	Doğal polimerler
<i>Alifatik esterler:</i>	<i>Modifiye polisakkaritler:</i>
Poli(L-laktik asit) (PLA)	Sellüloz
Poli(DL-laktik asit) (PDLLA)	Kitin
Poli(glikolik asit) (PGA)	Kitosan
Poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)	Dekstran
Poli(hidroksibütirat)	<i>Modifiye proteinler:</i>
Poli(dioksan)	Kollajen
Poli(anhidrit)ler	Jelatin
Poli(fosfazen)lar	Fibrin
Poli(ortoester)ler	Fibrinojen
Poli(siyanoakrilat)lar	Kazein
Polipeptitler	

Sentetik malzemelerin avantajı mekanik dayanım, bozunma hızı, mikroyapı ve geçirgenlik gibi özelliklerinin üretimleri sırasında kontrol edilebilir olmasından kaynaklanmaktadır. Doğal malzemeler ise hücre yapışmasını, dolayısıyla hücre çoğalmasını daha iyi destekler. Çoğalan hücrelerin normal işlevlerini yerine getirebilmeleri ve doku oluşumunu gerçekleştirebilmeleri için bu malzemelerin uygun özelliklere sahip olması ve gerçek doku mikroçevresine benzer olarak üç-boyutlu (3-B) yapıda inşa edilmesi gerekmektedir. Doku iskelesi olarak adlandırılan bu yapılar doku mühendisliğinin temel malzemesini oluşturmaktadır (Şenel 2004).

Doku-spesifik hücrelerin 3-B organizasyonlarını sağlamak amacıyla geliştirilmiş malzemeler iskele (scaffold) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 3.3). Doku iskelesi, yapay bir ekstraselüler (hücre-dışı) matriks (extracellular matrix=ECM) olarak düşünülmektedir. Gerçek dokuda bulunan ECM, hücreler için fiziksel destek sağlamanın yanı sıra hücre gelişmesi, farklılaşması ve işlevleri açısından önemli role sahiptir.



Şekil 3.3 İskele malzemenin genel görünüşü

Doku mühendisliğinde geliştirilen malzemelerin sahip olması gereken özellikler şu şekilde özetleyebiliriz:

- 1) Hücresel adezyonu ilerletmeli.
- 2) Hücre büyümesini artırmalı.

- 3) Biyouyumlu olmalı.
- 4) Yeni doku geliştikten ve hücreler yeni ECM oluşturabilecek kapasiteye ulaştıkları zaman iskeleye ihtiyaç duyulmaz. Bu nedenle malzemenin biyobozunur olması şarttır. Biyobozunma neticesinde oluşan ürünler zehir etkisi göstermemeli.
- 5) Yüksek poroziteye sahip olmalı.
- 6) Geniş yüzey alanına sahip olmalı.
- 7) Gözenek yapıları hücrelerin ve besinlerin geçişi için birbiriyle bağlantılı olmalı ve homojen dağılım göstermeli.
- 8) Doku rejenerasyonu gerçekleşinceye kadar mekaniksel özelliklerini korumalı.
- 9) İstenilen formda kolaylıkla üretilebilmeli.
- 10) Hücre yapışmasını ve işlevini artırıcı yüzey kimyasına sahip olmalı.
- 11) İskele yapıların gözenek boyutu hücre adezyonu, göçü, çoğalması (proliferasyonu) ve beslenmesi için önemli bir parametredir. Gözenek boyutu 10 μm 'den küçük olduğunda hücresel büyümeyi gerçekleştirmez, 15-50 μm olduğunda vasküler kümelenme gerçekleşir, 50-150 μm 'de osteoit büyüme gerçekleşir, 150 μm 'den büyük olduğunda ise iç bölgelerde mineralize kemik oluşumunu gerçekleştir (Cerroni *et al.* 2002). Kemik doku mühendisliğinde kullanılan iskele malzemelerin gözenek boyutu 240-300 μm , kalınlığı 1.5-2.5 mm aralığında değişmesi gerekmektedir.

3.3 Kemik Doku Mühendisliği Çalışmalarında Kullanılan Bazı Biyopolimerlerin, Biyoseramiklerin ve Kompozitlerin Özellikleri

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler yukarıda belirtilen özelliklere ilave olarak osteokondüktif olmalı, malzeme yüzeyi osteoblast ve osteoprojenitör hücrelerinin tutunmasını ve hareket etmesini desteklemelidir. Kemik rahatsızlıklarının iyileşme periyodunda mekanik özellikleri koruyabilen, resorbe olabilen malzemelerin kullanımı tercih edilmektedir (Cutright ve Hunsuck 1971). Metal ve metal alaşımları kristal yapıları ve mekanik özelliklerinden dolayı biyomalzeme alanında kullanılmaktadır. Ancak insan vücudu biyomalzeme olarak kullanılan metaller için oldukça korozif bir ortamdır. Ayrıca doku hassasiyeti, metal yorgunluğu, metal korozyonu ve metal

malzemelerin vücuttan çıkarılması için gerekli olan ikinci bir cerrahi işlem kullanımlarına kısıtlama getirmektedir (Yasunago *et al.* 1999). Osteosentetik implantların geliştirilmesinde özellikle poli(glikolik asit) (PGA), poli(L-laktik asit) (PLLA) , poli (L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi sentetik polimerlerle, kitosan, kollajen ve alginat gibi doğal polimerler ayrıca hidroksiapatit [HA, Ca₅(PO₄)₃OH] ve trikalsiyumfosfat [TCP, Ca₃(PO₄)₂] gibi biyoseramik malzemelerin kullanımı tercih edilmektedir.

3.3.1 Biyopolimerler

Biyopolimerler fiziksel yapısıyla vücuttaki yumuşak dokulara benzerlik gösterdiğinden, damar, kas, kıkırdak, kemik, cilt ve lens gibi dokuların yerine protez olarak kullanılmaktadır.

Biyopolimerler doğal ve sentetik polimerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

3.3.1.1 Doğal polimerler

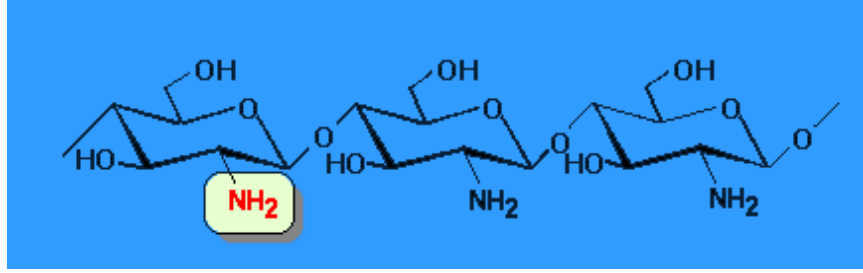
Proteinler (kollajen, jelatin, elastin, aktin, vb), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin, vb) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) biyolojik olarak üretilen doğal polimerlerdir. Doğal polimerler sahip oldukları işlevsel özelliklerden dolayı biyomalzeme alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Doğal kaynaklı biyopolimerler özellikleri (Kollajen, jelatin, kitosan, hyaluronat, vb.);

- 1) Biyouyum özellikleri çok yüksektir.
- 2) Mekanik özellikleri yetersizdir.
- 3) Hücre ile etkileşimleri yüksektir.
- 4) Biyobozunma özelliğine sahiptirler.
- 5) Doğada bol miktarda bulunmalarının yanında, kompleks yapıları sebebiyle modifikasyonları ve saflaştırılmaları oldukça zordur.

3.3.1.1.1 Kitosan

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinin kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilir. Glikozamin ve N-asetilglikozamin birimlerinden oluşan yüksek moleküler ağırlığına sahip doğrusal bir biyopolimerdir (Şekil 3.4). Kitosan reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en çok bulunan biyopolimerdir (Terbojevich *et al.* 2000, Roller *et al.* 2003). Elde edildiği kaynağa ve üretim yöntemine göre molekül ağırlığı 300 ile 1000 kD arasında olan kitosanlar elde edebilir.



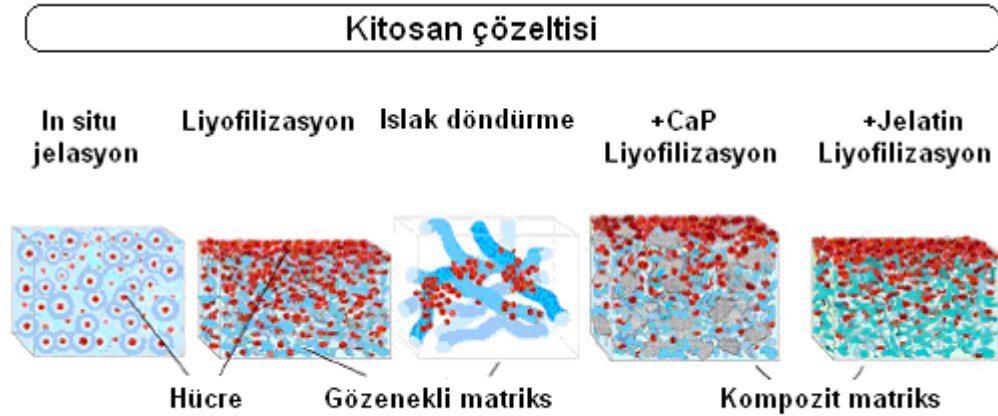
Şekil 3.4 Kitosanın formülü

Kitosan pH>7 olduğu sulu çözeltilerde çözünmezken, pH<6 olduğu seyreltik asit çözeltilerinde glikozamin birimlerindeki serbest amin gruplarının protonlanması ile çözünmektedir.

Kitosanın katyonik yapısı aniyonik glikozaminoglukanlar (GAG), proteoglukanlar, büyüme faktörleri ve DNA gibi negatif yüklü moleküllerle elektrostatik olarak etkileşmesine olanak sağlar. Bu özellikleri sayesinde doku mühendisliği ve gen mühendisliği çalışmalarında çeşitli formlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.5) (Park *et al.* 2000, Lee *et al.* 2000).

Çizelge 3.2 Kitosanın kimyasal ve biyolojik özellikleri

Kimyasal özellikleri	Biyolojik özellikleri
Katyonik bir poliamindir.	Biyoyumlu doğal bir polimerdir.
pH<6.5'te yüksek yük yoğunluğuna sahiptir.	Toksik değildir.
Negatif yüklü yüzeylere elektrostatik olarak bağlanabilmektedir.	Vücut içerisinde normal metabolik yollarla yıkıma uğramaktadır.
Yüksek molekül ağırlıklı lineer bir polielektrottur.	Antikansirojendir.
Aktif amino ve hidroksil gruplarına sahiptir.	Hücrelerin adezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler.
Hidrofiliktir.	

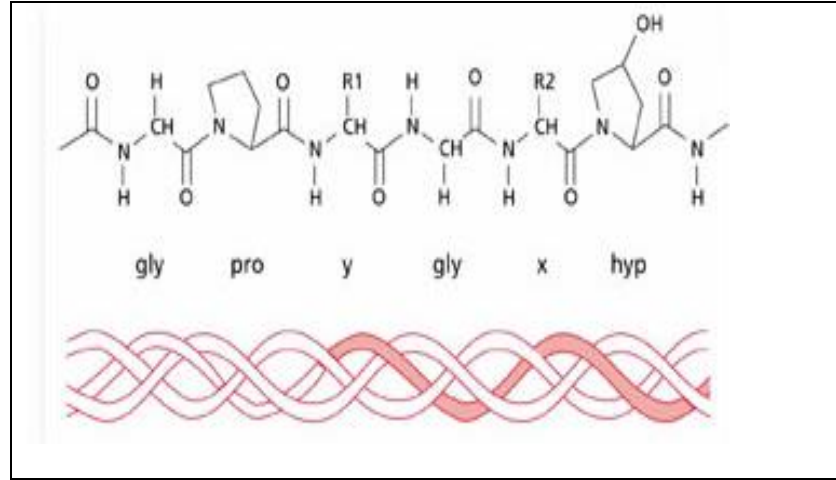


Şekil 3.5 Doku mühendisliğinde değişik kompozisyonlarda kullanılan kitosan iskeleler (Martino *et al.* 2005)

Kitosan kemik büyümesini desteklediğinden kemik doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kim ve arkadaşları osteojenik hücrelerin kitosandan hazırlanan iskele yüzeyine tutunduğunu ve kemik oluşumu sağladığını göstermiştir (Kim *et al.* 2002) Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle kitosanın kalsiyum fosfatlı (CaP) kompozitleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

3.3.1.1.2 Kollajen

Kollajen bağ dokusunda ve kaslarda bulunan, suda çözünmeyen yüksek gerinim gücüne sahip bir proteindir. Kollajen toplam vücut proteinlerinin yaklaşık 1/3'ünü oluşturur. Kıkırdakta % 50, korneada % 68, deride % 74 oranında bulunur. Kollajenin yapısında % 35 oranında glisin, % 11 oranında alanin ve diğer proteinlerden farklı olarak % 12 oranında prolin, % 9 oranında hidroksiprolin içerir. Kollajen molekülü üç tane polipeptit zincirinin birbiri etrafında dönmesi neticesinde oluşan sola dönen bir heliks yapısındadır (Şekil 3.6). Kollajen yıkıma uğrayabilen, immün tepki göstermeyen, trombojenik, düşük toksisitede, hücre büyümesini ve tutunmasını arttıran bir proteindir (Goissis *et al.* 1999). Bazı proteinlerle (fibronektin gibi) ve hücrelerle (trombositler ve fibroblastlar gibi) spesifik olarak etkileşebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı pek çok biyomedikal alanda kullanılmaktadır (Yannas and Burke 1980).



Şekil 3.6 Kollajenin yapısı

Kimyasal çapraz bağlayıcılar ile (metal iyonları, aldehitler gibi) yıkım (degradasyon) ve adsorpsiyon özellikleri geliştirilebilir. Çeşitli polimerlerle birleştirildiklerinde de kararlılıklarında artış gözlenmektedir (Harada *et al.* 2001).

Bugüne kadar belirlenmiş yaklaşık 19 tip kollajen çeşidi vardır. Tip-I kollajen hayvansal organizmalarda bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle medikal uygulamalarda en fazla uygulama alanı bulan protein olma özelliğine sahiptir.

Kollajen hayvansal dokulardan saf bir şekilde izole edilebilmektedir. Değişik şekillerde biyomalzeme yapımı için oldukça uygundur (sünger, boncuk, tüp formları gibi).

Biyouyumlu doğal bir protein olmasına rağmen kollajen-hücre etkileşimi kollajenin tipine, sekonder ve tersiyer yapısına ve çapraz bağ oranına göre farklılık göstermektedir.

3.3.1.2 Sentetik biyopolimerler

Endüstride çeşitli yöntemlerle sentez edilen poliester, polietilen ve poliamid gibi polimerler sentetik polimerler sınıfına girmektedir.

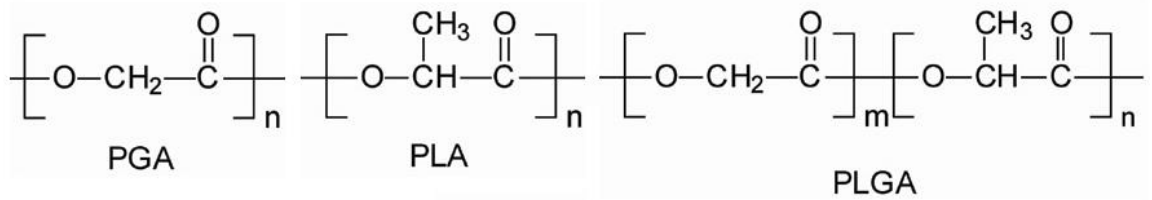
Sentetik kaynaklı polimerlerin genel özellikleri (PLA, PGA, PLGA, PVA, PMMA, vb.);

- 1) Biyouyum özellikleri değişkendir.
- 2) Sıcaklığa ve neme karşı duyarlıdırlar.
- 3) Yüksek miktarlarda üretilebilirler.
- 4) Genellikle yıkım oranları düşüktür.
- 5) Çok değişik kompozisyonlarda üretilebilmektedirler.
- 6) Kopolimerizasyon ve aşılama gibi tekniklerle malzemenin mekanik karakteri, geçirgenliği ve biyolojik özelliği geliştirilebilir.

3.3.1.2.1 Poli (α -hidroksi asitler)

Poli(glikolik asit) (PGA), poli(L-laktik asit) (PLA), poli(L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi polimerlerden oluşan poli(α -hidroksi asitler) doku mühendisliği

alışmalarında ve hücre transplantasyonlarında yaygın kullanılan FDA (Food and Drug Administration) onaylı malzemelerdir (Şekil 3.7) (Mikos *et al.* 1994).



Şekil 3.7 PGA, PLA ve PLGA polimerlerinin formülleri

3.3.1.2.1.1 Poli(glikolik asit) (PGA)

Kısa zincirli, polar bir malzemedir (Şekil 3.7). Organik çözücülerde çözünürlüğü çok düşüktür. Sulu çözeltilerde ve *in vivo* ortamlarda hızlı bir şekilde yıkıma uğramakta ve 2 ile 4 hafta içerisinde mekanik dayanımlarını kaybetmektedirler. Bu nedenle iskelelerin hazırlanmasında kullanım oranları düşüktür.

3.3.1.2.1.2 Poli(L-laktik asit) (PLA)

Yarı-kristalin, organik çözücülerde çözünen polimerik bir malzemedir (Şekil 3.7). Yapısındaki metil gruplarından dolayı PGA'ya göre daha hidrofobik bir malzemedir. Metil gruplarının sterik engellemesinden dolayı PLA'daki ester bağları hidrolize dayanıklıdır. Yıkımı yavaştır.

3.3.1.2.1.3 Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA 1960'lı yıllardan itibaren özellikle ameliyat ipliği malzemelerinde ve ilaç-salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan biyobozunur bir polimerdir. PLGA laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin kopolimerizasyonu ile sentezlenmektedir (Şekil 3.7). Laktik asit ve glikolik asit oranlarına bağlı olarak farklı özellikte PLGA'lar elde edilmektedir. Camsı geçiş sıcaklıkları 40-60°C'dir. Homopolimerlerinin aksine tetrahidrofur, aseton, etil asetat ve diklormetan gibi pek çok çözücüde

çözünebilmektedir (Thomson *et al.* 1995). Yıkım süreleri yeni doku oluşumunu sağlamak için yeterlidir (Mikos 2000). Ancak PLGA'nın yapısında bulunan ester bağları su içerisinde hidroliz olmaktadır. Hidrolitik yıkımları neticesinde asidik ürünler oluşmaktadır (Athanasίου *et al.* 1996). Bu asidik ürünler doğal metabolik yollarla organizmadan atılmalarına rağmen hastaların % 8'inde düşük inflamasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır (Sachlos and Czernuszka 2003). Düşen pH polimerin yıkım hızında artmasına neden olmaktadır. Bu malzemelerin kullanımdaki diğer problemler hidrofobik doğası ve düşük mekanik dayanımlarıdır. Bu problem malzemelerin özellikle kemik doku mühendisliğinde kullanımlarına kısıtlama getirmektedir.

3.3.2 Biyoseramikler

Biyoseramikler, vücutun zarar gören veya işlevini yitiren parçalarının tamiri, yeniden yapılandırılması ya da yerini alması için özel olarak üretilmiş seramiklerdir. Biyoseramikler, polikristalin yapıya sahip seramik (alümina ve hidroksiapatit), biyoaktif cam, biyoaktif cam seramikler veya biyoaktif kompozitler (polietilen–hidroksiapatit) şeklinde hazırlanabiliyor. İnorganik malzemelerin önemli bir grubunu oluşturan bu malzemeler, sağlık sektöründe çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktalar.

Biyoseramikler doku ile etkileşimlerine göre biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur seramikler olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Biyoinert seramikler canlı dokuyla reaksiyona girmeden kalabilen seramiklerdir. Biyoaktif seramikler kemikle ya da canlı organizmanın yumuşak dokusu ile kimyasal bağ yapma özelliğine sahiptirler. Biyobozunur seramikler ise zamanla yerleştirildikleri bölgede yeni oluşan doku ile yer değiştirir (Dubok *et al.* 2000).

3.3.2.1 Hidroksiapatit (HA)

Hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ kemiğin yapısında doğal olarak bulunan, kemik oluşumunu artıran biyouyumlu, osteokondüktif, biyoaktif, korozyona ve enfeksiyona

dayanıklı inorganik bir malzemedir (Dandurand *et al.* 1990, David *et al.* 2005). HA katyonik doğası sayesinde hücre kültürü çalışmalarında asidik çevre oluşumunu engellemektedir (Shikinami *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2004). Dünyada son otuz yıl içinde artan oranlarda, kemik ve dişlerin defekt, çatlak ve boşluklarının doldurulması ve tedavisinde kalsiyum fosfat esaslı biyoseramik protezler kullanılmaya başlanmıştır. HA seramiklerinin kemik iliği mezenkimal hücrelerinin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği belirtilmiştir (Ohgushi *et al.* 1990).

3.3.3 Kompozit malzemeler

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan 3-B iskeleler hücrelerle pozitif olarak etkileşebilen, hücrelerin adezyonlarını ve gelişimlerini olanaklı kılan bir mikroçevreye sahip olmalıdır. Hücre ve malzeme arasındaki etkileşim implant malzemenin doğal kemik dokusuna bağlanmasında ve fibröz kapsül oluşumun önlenmesi açısından oldukça önemlidir (Sun *et al.* 1997, Tanahashi *et al.* 2005).

Kemik doku mühendisliği çalışmalarında PLGA, kitosan, jelatin, kollajen ve kalsiyum fosfat seramikleri gibi çok sayıda malzeme kullanılmaktadır. Ancak her birinin kullanımında karşılaşılan çeşitli problemler mevcuttur. Biyoseramiklerin kullanımındaki temel problem, bazı klinik uygulamalardaki yavaş ilerleyen çatlakların, değişik darbe ve basınçlara dayanımlarının tam olarak tespit edilememesidir. Ayrıca bu malzemeler toz halinde kullanıldıkları zaman ilgili implant bölgesinden zamanla çevre dokulara yayılmaktadır. Bu sebeple yıkım süreleri beklenen sürenin altına inmektedir. Biyopolimerlerin kullanımındaki temel problem ise düşük biyouyumlulukları ve mekanik dayanımlarıdır. Bu olumsuzlukları önlemek için bu malzemelerin kombinasyonlarından hazırlanan kompozit malzemeler kullanılmaktadır.

İki veya daha fazla sayıdaki aynı veya farklı gruptaki malzemelerin, en iyi özelliklerini bir araya toplamak ya da ortaya yeni bir özellik çıkarmak amacıyla, bu malzemelerin mikro seviyede birleştirilmesiyle oluşan malzemelere “Kompozit malzeme” denir. Başka bir deyişle birbirlerinin zayıf yönünü düzelterek üstün özellikler elde etmek

amacı ile bir araya getirilmiş değişik tür malzemelerden veya fazlardan oluşan malzemeler olarak da adlandırılabilir. İmplantın vücuttaki kullanım alanlarına göre mekanik ve fizyolojik şartlara uyum sağlaması kolaylaştırmak amacıyla kompozit malzemenin bileşimi değiştirilebilir.

3.3.3.1 Malzeme yüzeylerinin mineralizasyonu

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemelerin kemiğe kimyasal olarak bağlanma yeteğine sahip olması gerekir. Kalsiyum fosfatlı malzemeler yüksek biyouyumluluk özellikleri ve kemik doku oluşumunu destekleme yeteneklerinden dolayı tercih edilmektedir. Polimer yüzeyinde kalsiyum fosfat benzeri apatit oluşumu sağlamak amacıyla kullanılan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri iyonik konsantrasyonu kan plazmasıyla benzer olan yapay vücut sıvısı (*Simulated Body Fluid*, SBF) adlı iyonik bir çözeltinin kullanımıdır (Çizelge 3.3) (Davies *et al.* 1996, Bayraktar *et al.* 2000).

Çizelge 3.3 Kan plazması ve SBF'nin iyon derişimlerinin kıyaslanması (mM/L) (Tanahashi *et al.* 1994)

İyonlar	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Kan plazması	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.50
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	4.2	148.0	1.0	0.50

Çizelge 3.4 Yapay vücut sıvısının (SBF'nin) bileşimi (Yokogawa *et al.* 1997)

Bileşik	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	TRIS
Derişim(mM)	141.0	4.0	2.5	1.0	1.0	0.5	50.0

pH'sı 7.4 olan çözeltilerde kalsiyum fosfatlar çözünmez ve malzeme yüzeyinde birikirler (Yeong *et al.* 2000). Malzeme yüzeyinde apatit oluşumu sağlamak için SBF'nin pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlanır. Hazırlanan bu çözelti içerisinde malzemeler apatit oluşumu sağlamak amacıyla bekletilir. Bekletme süresinin artışıyla apatit oluşumu artar. Ancak 4 haftadan sonra daha fazla apatit oluşumu meydana gelmez (Cho *et al.* 1996). Apatit kristal yapının oluşumu ortamın pH'sinden önemli ölçüde etkilenmektedir. pH 7.4'te ince tabakalar (*flake-like*) şeklinde oluşurken, pH 7.2'de daha kalın tabakalar (*plate-like*) şeklinde oluşmaktadır (Li *et al.* 1993).

3.4 İskele Hazırlama Yöntemleri

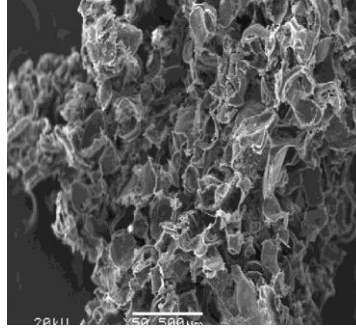
Doku iskeleleri ECM'yi taklit edecek biçimde tasarlanan yapay bir hücre-dışı matriks düşünülen yapılardır. Doku mühendisliğinin üç temel bileşeninden biri olan doku iskeleleri, hücreler için uygun yapışma yüzeyi oluşturmalarının yanı sıra, mekanik dayanım sağlamakta, fizyolojik ve biyolojik değişikliklere cevap vermek için çevre doku ile etkileşimin kurulmasına yardımcı olmaktadır. Gerçek hücre-dışı matrisin yeniden oluşumuna da katkıda bulunmaktadır. Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemelerin seçimi ve yöntemi oldukça önemlidir. Malzemelerin işlenmesi sonucu üretilen doku iskeleleri, gerek kimyasal bileşim, gerekse fiziksel yapı bakımından doğal ECM'nin yapısını ve biyolojik işlevini iyi bir şekilde taklit etmelidir.

Gözenekli iskelelerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden bazılarını şu şekilde sıralayabiliriz:

3.4.1 Partikül uzaklaştırma (*Solvent Casting / Particle Leaching*) yöntemi

Doku mühendisliği çalışmalarında iskele hazırlamak amacıyla en yaygın kullanılan yöntem partikül uzaklaştırma yöntemidir. Bu yöntemde polimer uygun bir organik çözücüde çözünür (Mikos *et al.* 1993b, Mikos *et al.* 1994). Hazırlanan polimer çözeltisi içerisinde NaCl, sakkaroz, şeker ve parafin gibi porojen partiküllerin bulunduğu kalıba dökülür. Organik çözücü tamamen buharlaştıktan sonra ele geçen kompozit yapı

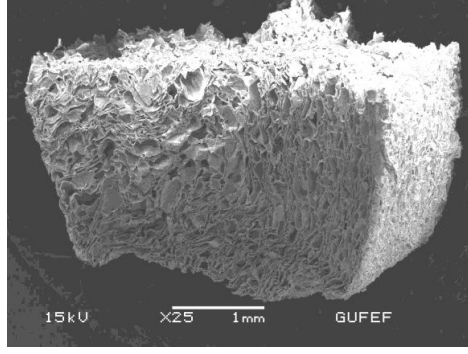
porojen partiküllerini uzaklaştırmak amacıyla uygun çözeltilere daldırılır. Porojen partiküllerinin yapıdan tamamen uzaklaştırılmasıyla gözenekli yapılar elde edilir. Porojen partiküllerinin boyutu iskelelenin gözenek boyutunu belirlemektedir (Şekil 3.8). Yöntemin en önemli avantajı gözenek boyutunun porojen partiküllerinin boyutunun değiştirilmesiyle kolaylıkla ayarlanabilmesidir. Ancak porojen partiküllerinin yapıdan uzaklaştırılması zor olduğundan iskele hazırlama zaman alıcıdır. Bu yöntemle elde edilen iskelelerin farklı hücre türleriyle etkileşimleri incelendiğinde yeni doku oluşumunda herhangi bir ters etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir (Freed *et al.* 1993, Ishaung *et al.* 1997, Ishaung-Riley *et al.* 1998, Goldstein *et al.* 1999).



Şekil 3.8 NaCl kullanılarak hazırlanan iskele yapının SEM mikrografı

3.4.2 Dondurarak kurutma (*Freeze-Drying*) yöntemi

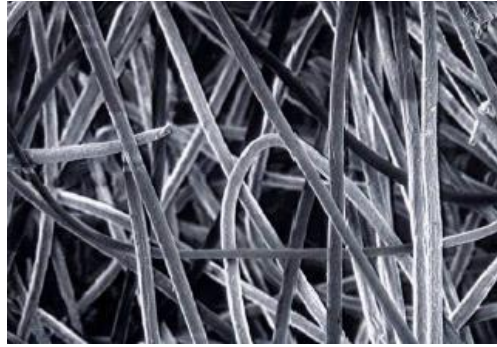
Liyofilizasyon biyolojik malzemelerin yapısını bozmadan yapılan bir kurutma işlemidir. Çeşitli sıcaklıklarda dondurulmuş polimer çözeltisinin yapısından donmuş çözücü kristallerinin liyofilizasyonla yapıdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. Neticede yüksek oranda gözenekliliğe sahip iskeleler elde edilmektedir (Şekil 3.9). Polimer konsantrasyonun ve sıcaklığın değiştirilmesi ile farklı morfolojilere bağlı iskeleler elde edilebilmektedir. İskele yüzeyinde oluşan ince polimer tabakası yöntemin dezavantajıdır. Ayrıca yöntem pahalı ve zaman alıcıdır.



Şekil 3.9 Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan kitosan/hidroksiapatit iskelenin SEM mikrografı

3.4.3 Lif bağlama (*Fiber Bonding*) yöntemi

Fiberlerin 3-B yapılarda bağlanması ile hücre tutunması ve büyümesi için geniş yüzey alanına sahip malzemeler elde edilir (Şekil 3.10). Liflerin birbirine bağlanmasında çözelti püskürtme (*Spray casting*) ve çözeltiye daldırma olmak üzere 2 yöntem kullanılmaktadır (Mikos *et al.* 1993b).

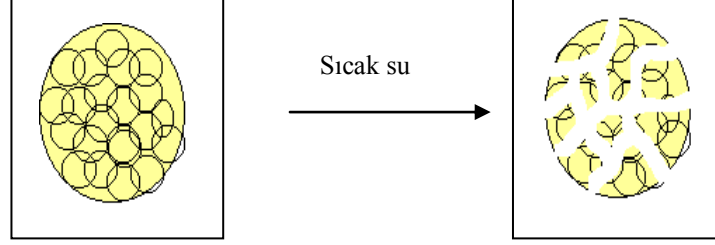


Şekil 3.10 PGA'dan hazırlanan lifin genel görünümü

3.4.4 Gazla köpüklendirme (*Gas Foaming*) yöntemi

Bu yöntemde polimerin metilen klorit ya da kloroform içerisinde hazırlanan çözeltisine amonyum bikarbonat ilave edilir. Oluşan viskoz karışım çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra ya vakum altında ya da sıcak su içerisinde bekletilir. Vakumda kurutma işlemi

sırasında amonyum bikarbonatın süblimleşmesiyle, sıcak su içerisinde bekletme sırasında ise CO₂ gazı çıkışı ile gözenekler oluşmaktadır. Neticede % 93 gözenekliliğe sahip malzemeler elde edilir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Gazla köpüklendirme yöntemi ile iskele yapıların hazırlanması

3.5 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri

Doku iskelesinin karmaşık doku yapılarını en iyi biçimde taklit etmesi gerekiyor. Yani fizyolojik olarak en uygun hücre ve doku modellerinin oluşturulması son derece önemlidir. Bu malzemeler çevredeki dokular ile etkileşim içinde olmalıdır. Bu amaçla, özellikle hücrelerin yapışmasını, farklılaşmasını, iletişimini sağlayan çeşitli proteinler (fibronektin, vitronektin ve laminin gibi) ve büyüme faktörleri yapıya katılır.

Büyüme faktörleri, polipeptitlerden oluşmuş yapılardır. Hücresel proliferasyonu ve farklılaşmayı, hücre göçünü ve adezyonunu ya inhibe eder ya da uyarır.

Osteoblastlar ve diğer kemik hücreleri pek çok büyüme faktörü ve sitokin sentezlese de çalışmalar kemik formasyonunun düzenlenmesindeki rolleri bilinen üç tane büyüme faktörü üzerine yoğunlaşmıştır (Bolander 1992, Canalis *et al.* 1993). Bunlar;

- 1) İnsülin-benzeri büyüme faktörleri (*Insulin-like growth factors*) (IGFs)
- 2) Dönüştürücü büyüme faktörleri (*Transforming growth factor-βs*) (TGF-βs)
- 3) Kemik morfojenik proteinleri (*Bone morphogenetic proteins*) (BMPs)

IGF'ler, TGF- β 'lar, ve BMP'ler, osteoblastlar ve diğerk kemik hücreleri tarafından üretilen, osteoblastların çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynayan büyüme faktörleridir.

Bu büyüme faktörleri;

- 1) Kırıkların iyileşme hızını artırır.
- 2) İmplant yüzeyinde kemik oluşumunu artırır.
- 3) Osteoporozda kemik oluşumunu artırır.

Büyüme faktörleri doku mühendisliği çalışmalarında çeşitli yöntemlerle kullanılmaktadır (Babensee *et al.* 2000). En basit yöntem biyoaktif molekülün ilgili bölgeye doğrudan enjeksiyonudur. Biyoaktif molekülün enjekte edildiğı bölgeden diğerk bölgelere hızlı bir şekilde difüzyona uğramasından dolayı etkin bir yöntem değildir.

Bu nedenle biyoaktif moleküllerin sentetik malzeme yüzeyine immobilize edilerek kullanılması tercih edilmektedir. Bu amaçla kullanılan 3 farklı yöntem mevcuttur.

- 1) Biyoaktif molekülün kimyasal yöntemlerle malzeme yüzeyine kovalent bağlanması
- 2) Spesifik moleküller yardımıyla biyoaktif molekülün malzeme yüzeyine bağlanması
- 3) Biyoaktif moleküllerin malzemeye çeşitli yöntemlerle emdirilmesi

Yöntemler basit olmasına karşın deneysel işlemler sırasında kullanılan yüksek sıcaklık ve/veya organik çözücüler proteinin denatüre olmasına ve biyolojik aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. *In vivo* uygulamalarda da fizyolojik sıcaklık, nem ve polimerin yıkımı neticesinde oluşan asidik ürünler proteinin üç boyutlu yapısını bozarak biyolojik aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu noktada devreye giren gen terapisi bu problemlere alternatif bir çözüm getirmiştir.

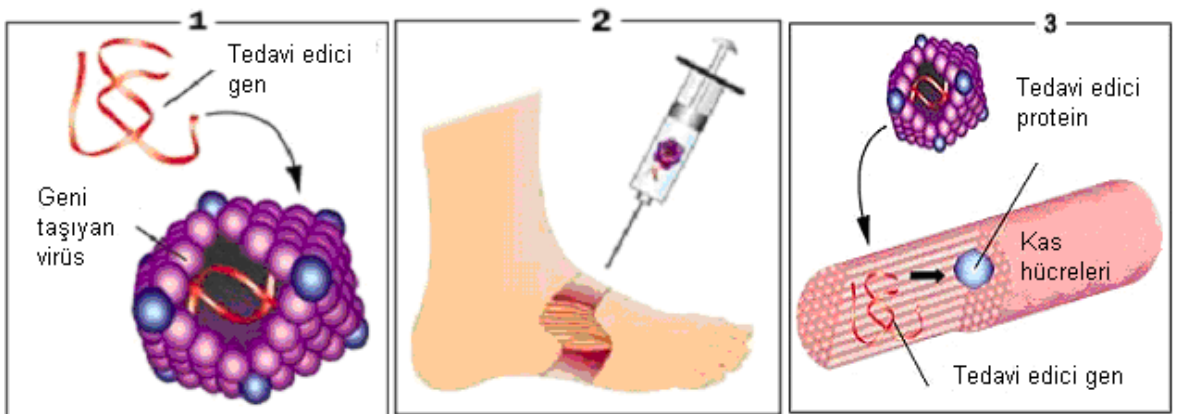
3.6 Gen Terapisi

Gen terapisinde amaç hastalık gelişimine sebep olan hatalı genin çeşitli yöntemlerle normal genle değiştirilmesidir. Bu terapide gerekli kimyasal maddeyi vücut dışarısından vermek yerine vücutun gereksinim duyduğu maddeyi (proteini) sağlıklı şekilde kendisinin üretmesini sağlanmaktadır. Hastalıkları tedavi etme ya da fiziksel etkilerini azaltma amacıyla hastanın vücutuna genetik materyalin sokulması, tıp tarihinde bir devrim olmuştur. İlk başlarda genetik hastalıkların tedavisi amacıyla planlanan gen terapisi artık, kanser, AIDS gibi diğer pek çok hastalığın tedavisi için de kullanılmaya başlanmıştır.

3.6.1 Genlerin vücuta aktarılma yöntemleri

Gen tedavisinde, etkin bir gen aktarımı en önemli koşuldur. Genleri istenilen hücrelere taşıyabilmek için *lipofection*, kalsiyum fosfat çöktürmesi, sonikasyon, direkt aktarım ve partikül bomdırmanı gibi çeşitli fiziksel yöntemler ile biyolojik vektörler kullanılmaktadır.

Doğrudan DNA enjeksiyonunda ilgili gen DNA'sını taşıyan virus doğrudan doğruya, örneğin kas içine, enjekte edilir (Şekil 3.12). Yöntem basit olmasına karşın kısıtlı bir uygulama alanı vardır.



Şekil 3.12 Genin vektör vasıtasıyla doğrudan enjeksiyonu

Lipozomlar, lipidlerden oluşan moleküllerdir. DNA'yı içlerine alma mekanizmalarına göre katyonik lipozomlar ve pH-duyarlı lipozomlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Birinci grup lipozomlar artı yüklü olduklarından, eksi yüklü olan DNA ile dayanıklı bir kompleks oluştururlar. İkinci grup lipozomlarsa negatif yüklü olduklarından DNA ile bir kompleks oluşturmaz, ama içlerinde DNA'yı taşırlar.

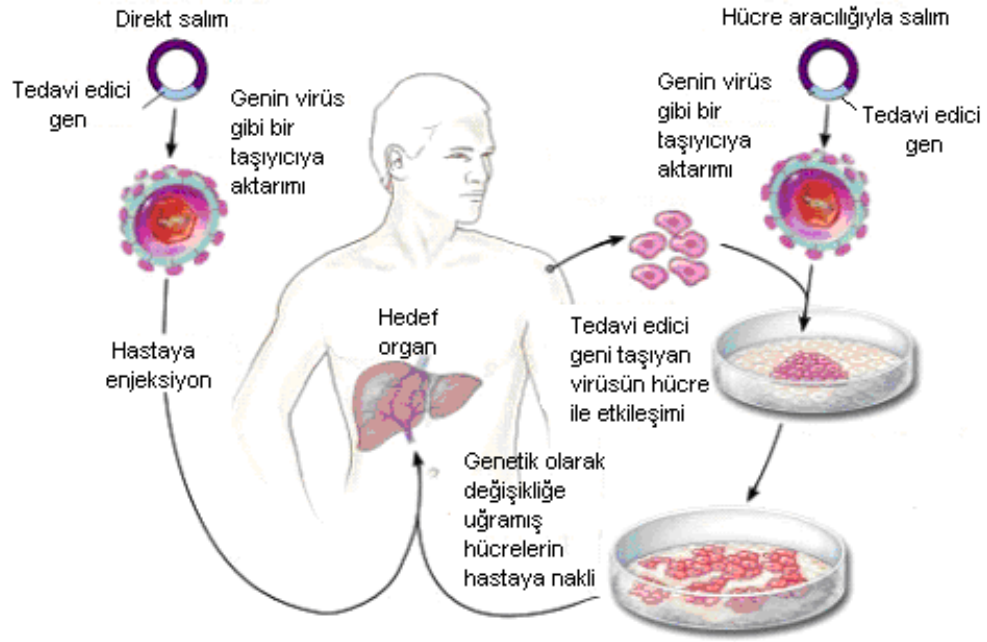
Parça bombardımanı ya da gen tabancası olarak da adlandırılan balistik DNA enjeksiyonu, ilk olarak bitkilere gen nakli yapmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu ilk uygulamalarından sonra, bazı değişiklikler yapılarak memeli hücrelerine gen nakli amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde, genellikle altın ya da tungstenden oluşan 1-3 mm boyutunda mikroparçacıklar, tedavi edici geni taşıyan plazmit DNA'sı ile kaplanır, sonra da bu parçacıklara hız kazandırılarak, hücre zarını delip, içeri girmeleri sağlanır.

Basit olmalarına karşın fiziksel yöntemler verimsizdir; ayrıca, yabancı genler, sadece belirli bir süre fonksiyonel kalabilmektedirler. Bu nedenle araştırmacıların çoğu, genellikle virüs kökenli vektörlere yönelmişlerdir. "Vektör" kelimesinin bir anlamı da "taşıyıcı"dır. Benzer şekilde, gen terapisinde genleri hücrelere taşıma amacıyla kullanılan ve genetik olarak zararsız hale getirilmiş virüslerde vektör denir.

Günümüzde yapılan araştırmalarda, virüslerin hastalığa yol açan gen parçalarının yerine, hastalıkları iyileştirme amacıyla rekombinant genler yerleştirilmektedir. Rekombinant genleri vücuta sokmak için *ex vivo*, *in vivo* ve *in situ* gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Ex vivo gen terapisinde, hastadan alınan hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılır ve vektör aracılığıyla iyileştirici genler bu hücrelere nakledilir (Şekil 3.13). Daha sonra, başarılı bir şekilde genleri içine almış hücreler seçilir ve çoğaltılır. Son aşamadaysa, çoğaltılan bu hücreler tekrar hastaya verilir ve genomlarının ekspresyonu sonucu genin kodladığı protein üretilmeye başlanır. Öte yandan, virüsün kendisini çoğaltmak için ihtiyaç duyduğu genler, tedavi edici genlerle değiştirilmiş olduğundan, virüs çoğalıp hücreyi patlatamaz. Bunun yerine, hücrede virüsün taşıdığı hastalığı düzeltici genin

ekspresyonu olur, genin kodladığı protein (yani ilaç) üretilir ve genetik bozukluk nedeniyle üretilemeyen proteinin yerini alır.



Şekil 3.13 Gen terapisinde kullanılan yaklaşımlar

Bu yaklaşımın avantajları şunlardır:

- 1) Gen aktarımı genel olarak yüksektir.
- 2) Eğer vektör seçilebilir markör gen taşıyorsa; gen aktarılan hücreler zenginleştirilebilir
- 3) Re-implantasyon öncesinde etkinlik kontrol edilebilir.

In vivo ve *in situ* gen terapisinde ise, genleri taşıyan virüsler doğrudan doğruya kana ya da dokulara verilir (Şekil 3.13). Bu aktarım, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilir ve hücreler alıcıya tekrar geri verilerek yapıldığı gibi alıcının dokusuna *in situ* direkt aktarım şeklinde de yapılabilir.

3.6.2 Gen tedavisinde viral vektörler

Viral vektörler hücre içerisine kolaylıkla girip kendi genetik materyalini hedef hücreye entegre edebilen vektörlerdir. Bu açıdan değerlendirildiklerinde viral olmayan sistemlerden daha etkin oldukları söylenebilir. Ancak her viral vektörün kendine özgü dezavantajları vardır:

- 1) Bölünmeyen hücreleri enfekte edememek (retrovirüs)
- 2) Olumsuz immünolojik etkiler (adenovirüs)
- 3) Sitotoksik etkiler (herpesvirüs)
- 4) Kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesi (adeno-ilişkili virüs)

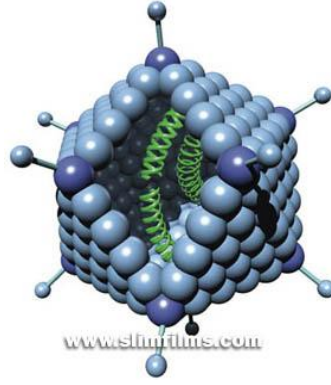
İdeal bir vektörde aranan özellikler;

- 1) Kolay tasarım
- 2) Etkin entegrasyon yeteneği
- 3) Kontrol edilebilir gen transkripsiyonu
- 4) İmmünolojik etkilerin minimum düzeyde olması

En çok kullanılan viral vektörler; adenovirüsler, retrovirüsler ve herpesvirüslerdir.

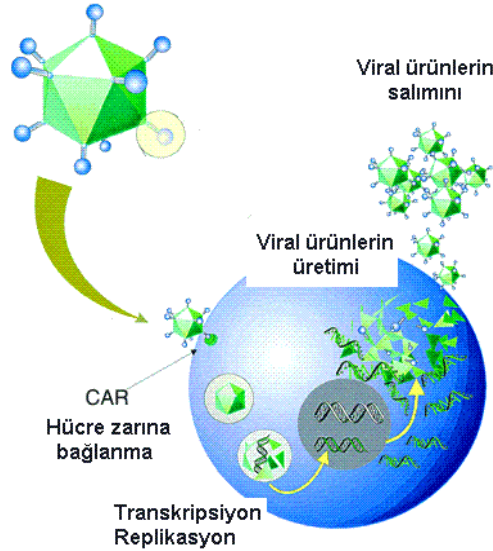
3.6.2.1 Adenovirüsler

Kapsid içerisinde bulunan 36 kb'lık DNA'ları ile karakterize edilen zarfsız virüslerdir (Şekil 3.14). Gen terapisi çalışmalarında taşıyıcı (vektör) olarak görev alırlar. Adenoviral vektörler, *in vitro* ve *in vivo* hedef hücre transdüksiyonunda oldukça etkilidir. Yaşam döngülerinde konak hücre genomuna entegre olmayıp çekirdekte epizomal elementler olarak replike olurlar.



Şekil 3.14 Adenovirüslerin genel yapısı (<http://www.slimfilms.com/medpage.htm>)

Adenovirüslerin hücreyi enfekte etmeleri oldukça kompleks bir mekanizmadır. Mekanizma virüsün hücre zarındaki reseptöre bağlanmasıyla başlamaktadır (Şekil 3.15). Viral vektör hücre içerisine endositoz yoluyla girmektedir. Endozom içerisindeki pH viral DNA'nın sitoplazma içerisine dağılmasına yol açar. Sitoplazma içerisine dağılan viral DNA'nın kapsidi parçalarına ayrılır ve çekirdeğe doğru ilerler. Viral DNA çekirdeğe girdikten sonra mekanizma replikasyon ve transkripsiyon olayları ile devam eder.



Şekil 3.15 Adenovirüslerin hücre içerisine girmelerinin şematik gösterimi

Adenovirüslerin avantajları:

- 1) Çok sayıda farklı türden izole edilebilirler.
- 2) Yüksek transdüksiyon etkinliğine sahiptir.
- 3) Transdüksiyon kolay ve basittir. Spesifik bir cihaza gerek duyulmaz.
- 4) Kolaylıkla manipule edilebilir.
- 5) Reporter gen salımı 24 saat içerisinde tespit edilebilir.

Dezavantajları:

- 1) Salım geçicidir.
- 2) İnsanda patojenik özellik gösterirler.

3.6.2.2 Retrovirüsler

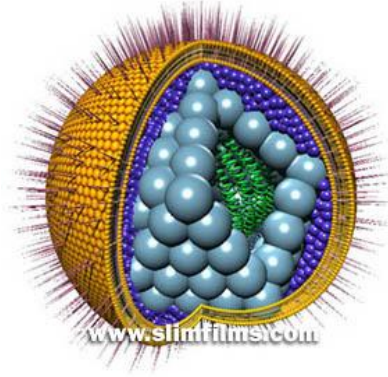
Retrovirüsler RNA molekülü içeren zarflı virüs sınıfında yer alırlar (Şekil 3.16). Viral genom yaklaşık olarak 10 kb'dır. Retrovirüsler; gag (merkez proteinini kodlayan gen), pol (revörz transkriptazı kodlar) ve env (viral envelop proteini kodlar) en az üç gen içerirler. Hücreye infekte olduktan sonra revörz transkriptaz enzimlerini kullanarak dsDNA'larını sentezler ve bu şekilde konakçı genomuna entegre olurlar. Transkripsiyon ve translasyon aşamaların gerçekleşmesiyle hücre içerisinde özelliklerini ifade etmeye başlarlar. Human immunodeficiency virus (HIV) bir retrovirüstür.



Şekil 3.16 Retrovirüslerin genel yapısı (<http://www.slimfilms.com/medpage.htm>)

3.6.2.3 Herpesvirüsler

Herpesvirüsler, ikozahedral kapsid ile çevrilmiş bir zara sahip, yaklaşık 100 nm çapında büyük bir ds DNA (245 kbp) içeren bir virüslerdir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Herpesvirüslerin genel yapısı (www.slimfilms.com/medpage.htm)

3.6.3 Gen tedavisinde viral olmayan vektörler

Viral vektörlerin kullanımdaki karşılaşılan problemlerden kaçınmak için çeşitli non-viral vektörler geliştirilmiştir. Viral olmayan vektörler DNA'nın hücre içerisine girmesini sağlamaktadır. Kompleks DNA hücre membranına bağlandıktan sonra ya spesifik olmayan yöntemlerle ya da reseptörler vasıtasıyla endositoz yoluyla hücreye alınmaktadır. Viral olmayan gen terapisinin temeli DNA ile kompleks oluşturan sentetik polikasyonlara dayanmaktadır. Polikasyonlar ile elektrostatik olarak etkileşen DNA yoğunlaşır. Böylece DNA hem nükleazlardan korunmuş olur, hem de hücre içerisinde daha etkin salınır. DNA'nın katyonik lipidlerle vermiş oldukları kompleksler de lipofleks (*lipoplex*) olarak adlandırılmaktadır. Lipofleksin stabilitesi lipid/DNA oranına bağlıdır. Katyonik polimerlerin kullanımı lipozomlara göre daha yaygındır. Çünkü bu polimerler plazmid DNA'ya elektrostatik olarak etkileşime girerek DNA'yı yoğunlaştırarak onu nükleazlardan korur ve kontrollü gen ekspresyonu sağlar. Ayrıca polimer yüzeyi, hedef hücrenin spesifik reseptörlerine bağlanma yeteneğinin artması için modifiye edilebilmektedir. Kısaca polimerler biyouyum, minimum immünolojik

etki ve minimum sitotoksitise gibi özellikleri ile viral vektörler ve lipidler aracılığıyla gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmalarına alternatif bir çözüm getirmişlerdir.

3.7 Hücre Kaynakları

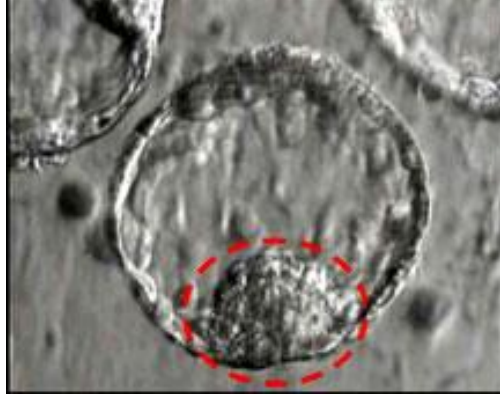
Kemik doku mühendisliğinde en öncelikli konulardan biri uygun bir hücre kaynağının bulunmasıdır. Yakın zamanda bilim adamları kendini yenileme, sınırsız bölünme ve birçok hücre tipi veya dokuya farklılaşabilme kapasitesine sahip yegane hücre topluluğu olan kök hücreleri keşfetmiş ve bu alanda önemli çalışmalar başlatmışlardır. Kök hücreler çoğalırken, bir yandan da farklılaşarak ait oldukları organın temel işlevlerini kazanırlar. Yaralanma veya hastalık sonucunda hasarlanan hücrelerin yerini dolduracak hücelere yön vererek dokudaki dengenin sağlanmasında görev alırlar.

3.7.1 Kök Hücre Kaynakları

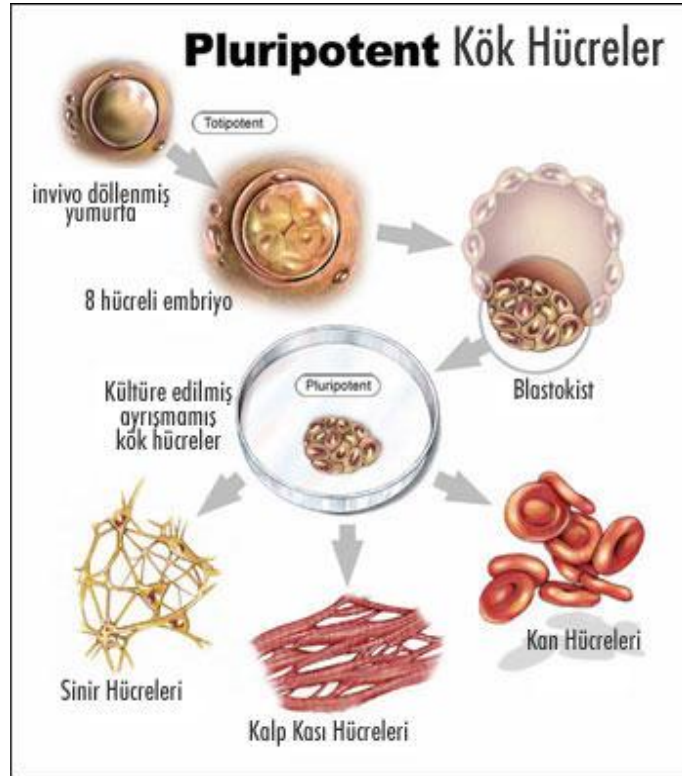
3.7.1.1 Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler blastokist denilen 4-5 günlük embriyonun iç hücre kütesinden elde edilirler (Şekil 3.18). Blastokist embriyonun rahim duvarına yerleştirilmeden önceki safhasıdır. Bu safhada embriyo 150 hücreden oluşan ve dış kısmında yuvarlak daire oluşturacak şekilde dizilmiş hücreler (trofektoderm) sıvı dolu bir kavite (blastosel) ve iç kısmında bir küme hücre içeren bir yapı şeklindedir.

Embriyonik kök (EK) hücrelerden hücre kültürü oluşturabilmek için blastokistin dış kısmı çıkarılır ve iç hücre kütesi elde edilir. Bu hücrelerin kültüre edilmesi sonucunda pluripotent kök hücreleri elde edilir (Şekil 3.19). Pluripotent özelliğe sahip bir kök hücre kendini yenileme özelliğine sahiptir ve pek çok vücut hücresine dönüşebilir.



Şekil 3.18 Blastokist aşamasına ulaşmış bir embriyo (İşaretlenmiş kısım embriyonik kök hücrelerin elde edildiği iç hücre kütlesi hücrelerini göstermektedir)



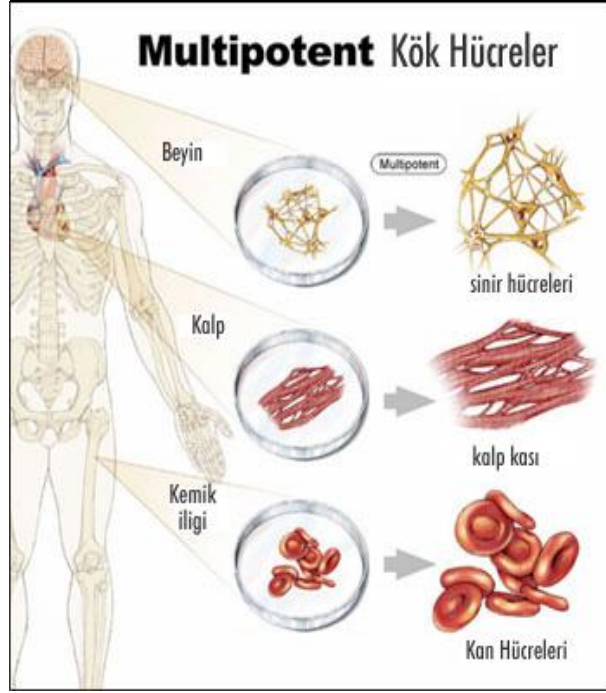
Şekil 3.19 Pluripotent kök hücrelerin çeşitli vücut hücrelerine dönüşümlerinin şematik gösterimi (www.stemcellresearchfoundation.org)

3.7.1.2 Erişkin kök hücreler

Erişkin kök hücrelerinin, diğer tüm kök hücreler gibi iki önemli özelliği vardır. Birincisi, uzun süre kendilerini kopyalayabilme özelliğine sahiptirler. İkincisi, özel bir fonksiyonu ve morfolojisi olan spesifik bir hücreye dönüşebilirler. Kök hücreler diferansiye olmadan önce ara bir safha geçirirler. Bu safhadaki hücrelere öncü veya progenitor hücre adı verilir. Fetal ve erişkin dokudaki progenitor hücreler yarı farklılaşmışlardır ve bölünerek olgun hücrelere diferansiye olabilirler, yani multipotenttirler (Şekil 3.20).

Erişkin tip kök hücreler dokularda nadir bulunurlar. Birincil görevleri bulundukları dokuda hücre ölümü veya doku hasarı meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir etmektir. Bulundukları ortama göre farklı davranış gösterirler. Örneğin; hematopoetik kök hücreler olgunlaşmış kan hücrelerine dönüşmek üzere kemik iliği tarafından sürekli üretilirler. Bu hücrelerin en önemli görevleri kan hücrelerini yenilemektir. Bunun tersine ince barsaktaki kök hücreler sabittir ve fiziksel olarak oluşturdukları olgun hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Kök hücresi içerdiği bildirilen erişkin organ ve doku listesine her gün bir yenisi eklenmektedir. Bunlar arasında kemik iliği, periferik kan, beyin, spinal kord, diş kökü, kan damarları, çizgili kas, derinin epitel tabakası, sindirim sistemi, kornea, retina, karaciğer ve pankreas bulunmaktadır.

Bir hücrenin erişkin tip kök hücre olarak tanımlanabilmesi için, o hücrenin organizmanın yaşamı boyunca kendini yenileyebilmesi gerekir. Buna ilave olarak, bu tip kök hücrelerin klonlanabilmesi gerekir, diğer bir deyişle ihtiyaç olduğunda olgunlaşmış hücrelere dönüşebilecek kendisiyle aynı genetik özelliklere sahip hücreler üretebilmeleridir. Dönüştüğü hücrelerin tamamıyla olgun bir hücre fenotipinde olması, bulunduğu dokuya entegre olması ve o dokuya ait fonksiyonu yerine getirebilmesi gerekir. Fenotip terimi, o hücreye ait gözlenebilen tüm özellikleri içerir. Bunlar; hücrenin şekli, diğer hücrelerle olan ilişkileri ve bulunduğu ortam, hücre yüzeyinde bulunan proteinler ve hücrenin davranışları ile ilgilidir.



Şekil 3.20 Multipotent kök hücrelerin çeşitli vücut hücrelerine dönüşümlerinin şematik gösterimi (www.stemcellresearchfoundation.org)

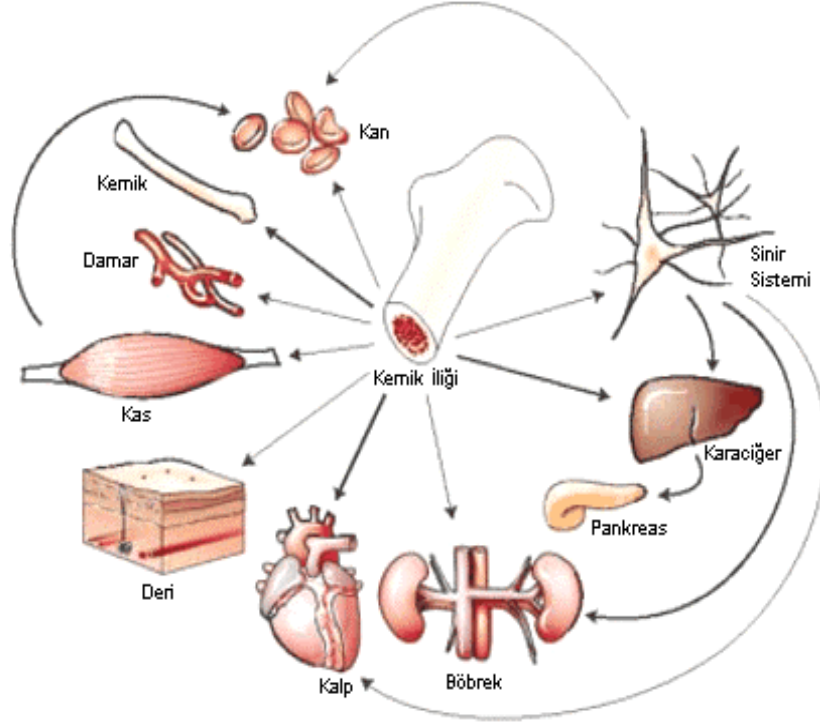
3.7.1.2.1 Erişkin kök hücre tipleri

1) Sinir sistemindeki erişkin tip kök hücre: Bilim adamları fetus ve erişkin beyinde bulunan kök hücrelerin bölünerek yeni kök hücreler oluşturduğunu veya precursor hücrelere dönüştüğünü tahmin etmektedir.

2) Kemik iliğindeki kök hücreler: Kemik iliğinde hematopoetik kök hücreler ve hemotopietik olmayan kök hücreler (stromal veya mezenkimal kök hücreler; MKH) olmak üzere iki tür kök hücre vardır.

Bilim adamları 50 yıllık bir çalışmadan sonra kan elemanlarını meydana getiren hematopoetik kök hücreleri hakkında yeterli bilgiye ulaşmışlar ve tedavide kullanmaya başlamışlardır. Bugün kan, immun sistemi ve kanser hastalıklarının tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin kemik, kıkırdak, yağ ve kas fibröz dokularını meydana getirdiğini göstermiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.21 Kemik iliği hücrelerinin çeşitli vücut hücrelerine dönüşümlerinin şematik gösterimi (www.stemcells.nih.gov)

Kemik doku mühendisliği açısından MKH'ler pek çok avantaja sahiptir.

- 1) İzolasyonları kolaydır.
- 2) Kültür kapına yapışma özelliğine sahiptirler.
- 3) Yüksek oranda çoğalma kapasitesine sahiptirler.
- 4) İstenilen hücre tipine (kemik, kıkırdak, yağ vb) dönüştürülebilirler.
- 5) Kemik oluşumu hücrelerin pasaj sayısından bağımsızdır.
- 6) Dondurma koşulları hücrelerin osteojenik potensiyellerini değiştirmemektedir.

3) Endotelyel progenitor hücreler: Endotelyal hücreler tüm vücuttaki damar duvarlarının iç kısmını döşeyen hücrelerdir ve embriyonik ve erişkinlerde spesifik endotel kök hücrelerini tesbit etmek zordur.

4) Çizgili kas kök hücreleri: Çizgili kas kök hücrelerine *satellit hücreler* (uydu hücreler) denir. Satellit hücreler kas büyüme hormonu salgırlar. Normalde bölünmeyen hücreler olmalarına rağmen hasar sonrasında veya sportif egzersizle çoğalabilirler.

5) Deride ve sindirim sisteminde epitelyal hücre prekürsörleri: Vücuttaki diferansiye olmuş hücrelerin % 60'ını oluşturan epitelyal hücreler vücutun iç ve dış yüzeyini kaplarlar. Bu hücreler sürekli yenilenirler. Memelilerin derisinde epidermal hücreler, saç follikül hücreleri, salgı bezi hücreleri olmak üzere üç çeşit epitel hücresi bulunur.

5) Pankreas ve karaciğerdeki kök hücreler: Erişkin memelilerde pankreas ve karaciğer, kök hücreler tarafından yenilenebilen değişik tipte diferansiye hücreler içerir. Erişkin pankreasında kök hücrelerin pankreatik kanalda veya adacığın kendisinde bulunduğu düşünülmektedir.

3.7.2 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan diğer hücre kaynakları

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşabilme yeteneğinin olması gerekmektedir. Kalvaria, kemik iliği, uzun kemik gibi farklı kaynaklardan elde edilen osteoprogenitör hücreler ve primer osteoblastlar kemik doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücre kaynaklarının yanı sıra MC3T3-E1, SAOS-2 ve UMR-106 gibi osteoblast benzeri hücre dizileride doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Ahmad *et al.* 1999, Lisignoli *et al.* 2001, Ehara *et al.* 2003).

MC3T3-E1 hücreleri yeni doğmuş farelerin kalvarialarından izole edilen ölümsüzleştirilmiş preosteoblastlardır. Kolaylıkla kültüre edilebilen ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip hücrelerdir.

3.8 Hücre Kültürü Yöntemleri

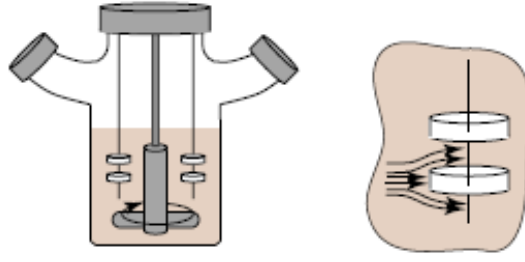
İzole edilen hücreler uygun ortam koşullarında kültüre edildikten sonra gerekli farklılaşma sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin bulunduğu ortam koşullarında hazırlanan üç boyutlu iskele malzemelere tohumlanmakta ve kültüre edilmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan çok sayıda statik ve dinamik kültür sistemleri mevcuttur. T-flaks'ler ve çok kuyucuklu petriler gibi statik kültür sistemleri en yaygın kullanılan sistem olmalarına rağmen çeşitli sınırlamalara sahiptirler. Bu sistemlerde düzenli bir karıştırma işlemi olmadığından besinlerin, oksijenin, büyüme faktörlerinin iskele içerisinde homojen bir dağılımı söz konusu değildir.

Biyoreaktörler biyolojik ve biyokimyasal olayların kontrollü ortamlarda (pH, sıcaklık, beslenme, atık ürünlerin uzaklaştırılması) meydana gelmesini sağlayan cihazlardır (Martin *et al.* 2004). Bu nedenle biyoreaktörler statik sistemlere göre daha avantajlıdır. Döner kap (*spinner flaks*), perfüzyon kültürler, mikrot taşıyıcı-destekli reaktörler, içi boş (*hollow*) fiber karıştırmalı reaktör ve döner-duvarlı reaktör olmak üzere çeşitli biyoreaktör tipleri mevcuttur (Darlig and Athanasiou 2003).

3.8.1 Döner kap (*Spinner flask*) reaktörler

En basit biyoreaktör modellerinden biridir (Şekil 3.22). Hücrelerin tohumlandığı materyal, kabın tıpasından sarkan çubuklara tutturulur ve materyallerin tamamını kaplayacak şekilde besiyeri ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile reaktörün karışması sağlanır. Yüksek besin konsantrasyonu sağlamak için besiyeri birkaç günde bir değiştirilir. Freed ve grubu tarafından yapılan çalışmalar, döner kap reaktörlerinde 5 hafta sonunda elde edilen dokuların petri kaplarındakine göre daha kalın ve geniş olduğunu göstermiştir (Freed and Vunjak-Novakovic 2000).



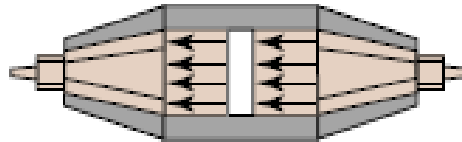
Şekil 3.22 Döner kap reaktörlerin genel görünümü

3.8.2 Mikrotaşıyıcı-destekli reaktörler

Bu tür reaktörler doku üretimi için değil, büyük-ölçekli kondrosit kültürü elde etmek için kullanılmaktadır. Genellikle kollajen veya dekstran yapısındaki mikroküreler (150-300 μm çapında) sürekli karıştırılmalı bir reaktörde, besiyeri içerisinde asılı durumda tutulur ve kondrositler de reaktöre eklenir. Mikrotaşıyıcılara yapışan hücreler burada üreyerek çoğalırlar. Besiyeri devamlı değiştirilir. Yapılan çalışmalar, hücre üreme hızının petri kaplarındakine göre 2 kattan daha fazla olduğunu göstermiştir. Karıştırmadan kaynaklanan kayma gerilimlerini ortadan kaldırmak için mikrotaşıyıcılar, akışkan yatak ya da hava-kaldırmalı reaktörler de kullanılabilir.

3.8.3 Perfüzyon kültürler

Hücreler destek materyallerine ekilerek reaktöre yerleştirilir. Sonra besiyeri bir peristaltik pompa yardımıyla belli bir akış hızında reaktöre gönderilir ve atık ürünler bir çıkış kanalından reaktörü terk ederler. Böylelikle karışma hızının istenmeyen etkisi de ortadan kaldırılmış olur (Şekil 3.23).

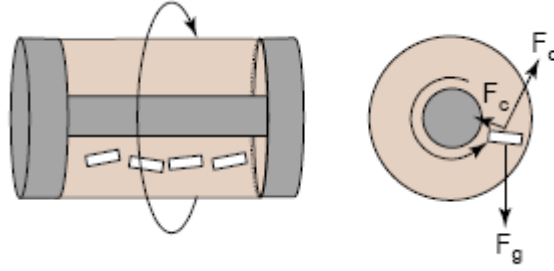


Şekil 3.23 Perfüzyon kültür kapının genel görünümü

3.8.4 Döner-duvarlı biyoreaktörler (*Rotating wall vessels, RWVs*)

NASA tarafından geliştirilmiş mikroçekim temelli döner-duvarlı reaktörler yüksek yoğunlukta ve geniş skalalarda 3-B hücre kültürlerini destekler (Qui *et al.* 1998) Hücreler için en önemli besin ve aerobik solunumda görev alan oksijenin kontrollü dağılımını sağlar (Schwarz *et al.* 1992).

Bu tip biyoreaktör sistemlerinde, hücre-malzeme yüzeyine etki eden kuvvetlerin (F_d , F_c ve F_g) bileşkesi sıfırdır. Bu nedenle hücre-iskele yapıları bu sistem içerisinde askıda gibidir. Yani yerçekimsiz bir ortam söz konusudur (Şekil 3.24). Döner duvarlı biyoreaktör sistemlerinin diğer bir avantajı karıştırma işleminin yapının dönmesi ile sağlanmasıdır. Böylece karıştırmadan kaynaklanan kayma gerilimi azalmaktadır (Unsworth and Lelkes 1998).



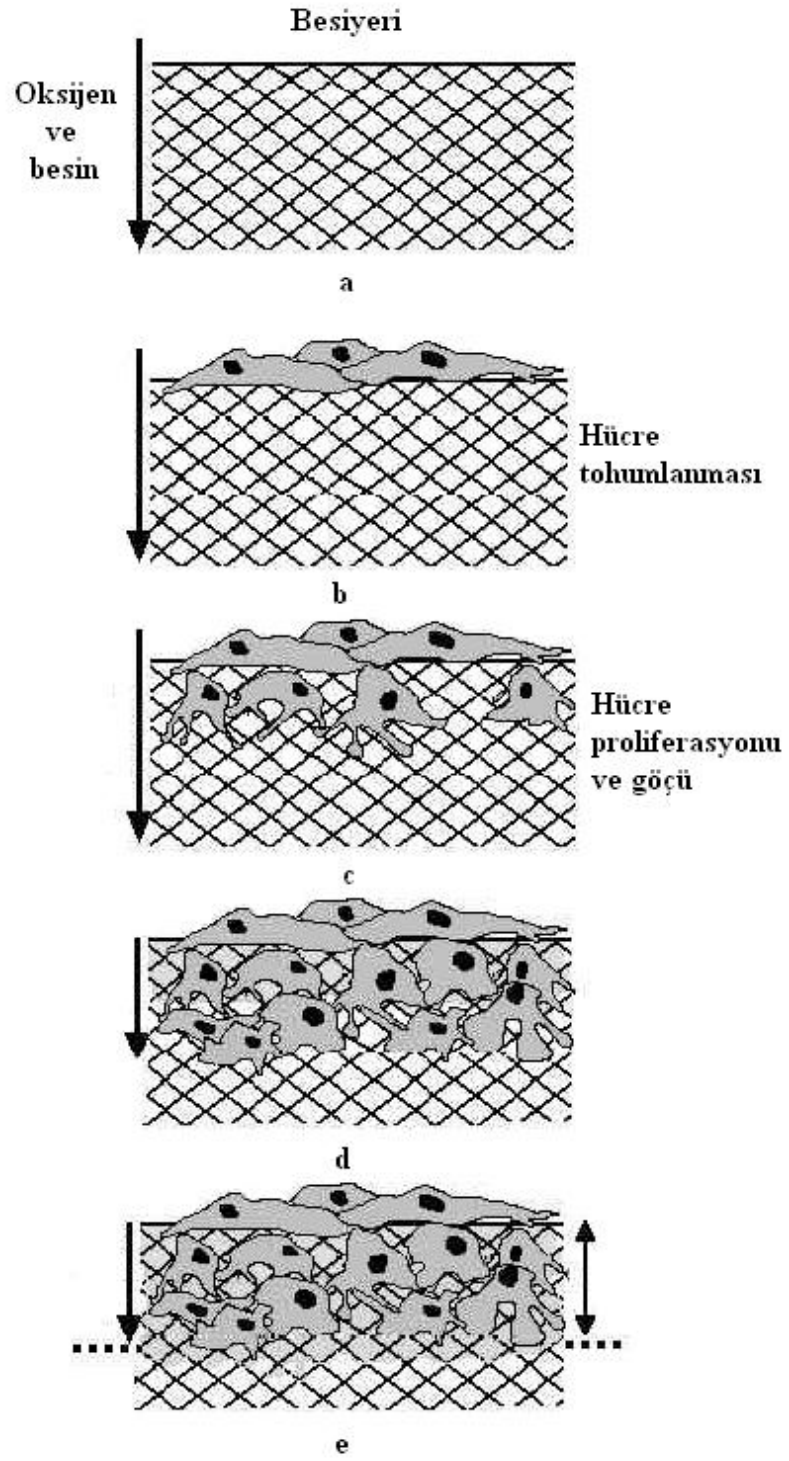
Şekil 3.24 Döner duvarlı biyoreaktör sistemlerinin genel görünümü (F_d merkezkaç kuvveti, F_c santrifüj kuvveti, F_g yerçekimi kuvveti)

Özetle biyoreaktörler; üç boyutlu ortamı destekler, düzgün karıştırma ile gerilimi azaltır, besin difüzyonunu kolaylaştırır, matriks sentezini hızlandırır, proliferasyonu, rediferansiyasyonu uyarır (Vunjak-Novakovic *et al.* 1999).

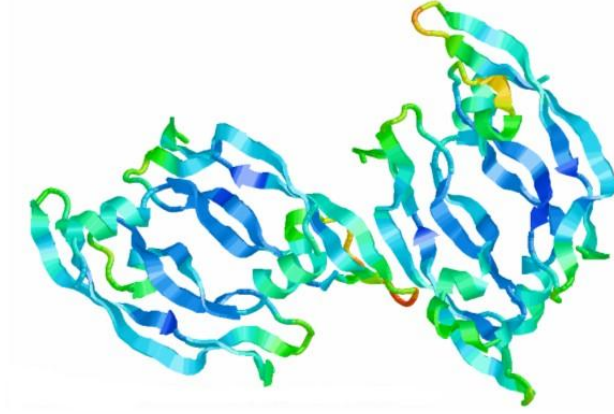
Bu nedenle istenilen boyutlara sahip doku üretiminde RCCS-STLV biyoreaktörlerinin kullanımıyla, diğer tekniklere göre önemli avantajlar sağlanacağı düşünülmektedir

3.9 Anjiyogenez

Kemik doku mühendisliğinde her hücre-biyopolimer implantında karşılaşılan önemli bir sorun; biyopolimer yapının içindeki hücrelerin beslenmesi ve oksijenlenmesidir. Hücre tohumlamasının ardından hücreler çoğalmaya ve iskeletin gözeneklerine doğru göç etmeye başlarlar (Şekil 3.25.a). Gözeneklere adeze olan hücreler hücre-dışı matrikslerini üretmeye başlarlar (Şekil 3.25.b). İskelenin yüzeyinde bulunan hücreler oksijen ve besini büyük ölçüde tüketmektedir. Bu hücreler difüzyona kısıtlama getirirerek oksijen ve besinin iskele içerisine girmesini engellerken aynı zamanda atık ürünlerin yapıdan uzaklaşmasında önlerler. Bu sebeplerden dolayı hücreler iskele içerisinde daha derinlere ilerleyememektedir (Şekil 3.25.e). Kemik doku mühendisliğinde yüksek orandaki besin ve oksijen malzeme yüzeyinde mineralizasyonu artırırken, malzeme içerisine kitle transferine kısıtlama getirmektedir (Martin *et al.* 1998). Sadece yüzeye yakın hücreler hayatta kalmaktadır. Kondrositler dışında hiçbir hücre kan damarlarından 25-100 µm uzakta yaşamlarını sürdüremezler (Vander *et al.* 1985, Guyton and Hall, 1996). İnsan vücudunda dokular için gerekli olan besin ve oksijen kan damarları vasıtasıyla sağlanmaktadır. Doku mühendisliği iskelelerinde oksijen ve besinin malzemenin dip kısımlara kitle halinde transferi ve atık ürünlerin yapıdan uzaklaştırılması için yapay damar oluşumun sağlanması oldukça önemlidir. Dünyada ileri laboratuvarlarda üzerinde yoğun çalışmaların sürdüğü bu ‘implant damarlanması’nın gerçekleşmesi için damarlanmayı uyarıcı bir protein olan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) kullanılmaktadır. VEGF kan ve lenf damarları başta olmak üzere vasküler endotelyal hücrelerin kısacası tüm vasküler sistemin büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen yani anjiyogenezde önemli rol alan bir proteindir (Şekil 3.26).



Şekil 3.25 Hücrelerin iskele yüzeyindeki davranışları (Sachlos and Czernuszka 2003)



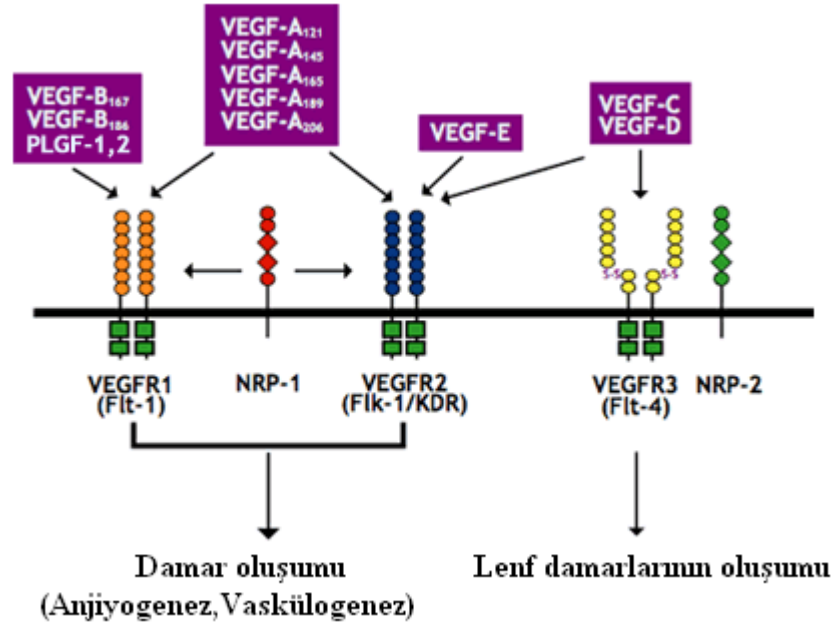
Şekil 3.26 VEGF'nin yapısı

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) süper ailesinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü adı verilen altı üyeden meydana geldiğini göstermiştir (Çizelge 3.5). VEGF'in endotel hücre membranına bağlanmasında ve aktive olmasında VEGF reseptör-1 (VEGFR-1 ya da flt-1) ve VEGFR-2 (flk-2 ya da KDR) görev almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar VEGF reseptörlerinin bazı tümör hücre yüzeylerinde bulunduğunu göstermiştir (Ferrara 2004).

VEGF neuropilin-1 (NP-1 ya da NRP-1) ve NP-2 (NPR-2) olarak adlandırılan yapısal olarak VEGFR reseptörlerinden farklı olan reseptörlerle de etkileşebilir. Bu reseptörler endotel hücreler tarafından sentezlenir ve VEGFR-2'nin mitojenik etkisini artırır (Hanahan and Weinberg 2000). VEGF'in VEGFR ailesi reseptörlerinden birine bağlanmasıyla endotel hücrelerin çoğalmasını ve göçünü sağlayan bir kaskat sinyal sistemi devreye girer ve yeni damar oluşumları gerçekleşir (Şekil 3.27).

Çizelge 3.5 VEGF ailesinin üyeleri

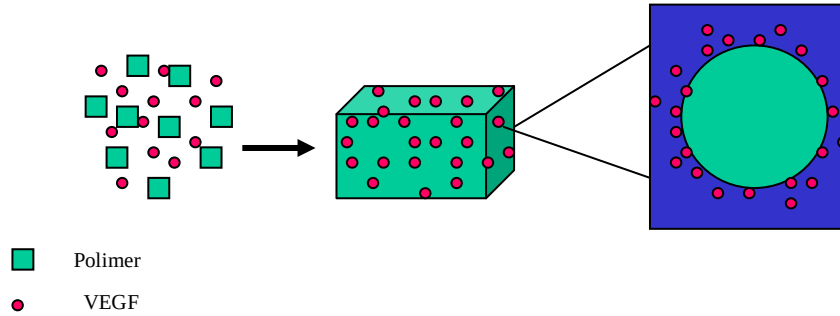
VEGF ailesi üyeleri	Reseptör	Görev
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1	Anjiyogenez Vaskülarizasyon
VEGF-B	VEGFR-1	Belirlenmemiş
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Lenf damarlarının oluşumu
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Lenf damarlarının oluşumu
VEGF-E (viral faktör)	VEGFR-2	Angiogenesis
Plasental büyüme faktörü (PlGF)	VEGFR-1, neuropilin-1	Anjiyogenez İnflamasyon



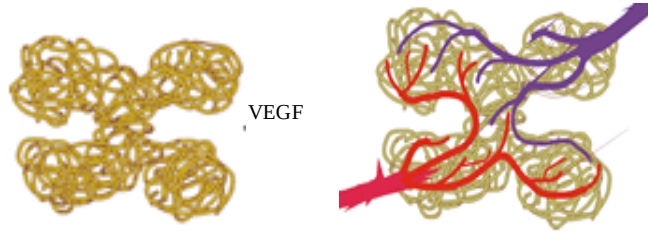
Şekil 3.27 VEGF ligandlarının reseptörlerle etkileşimlerinin şematik gösterimi

Kemik oluşumunda angiogenезin önemi 1763 yılında Albrecht von Haller tarafından belirlenmiştir. Aynı dönem içerisinde John Hunter'de vaskülarizasyonun kemik gelişim sürecinde ve kemik hasarlarının onarılmasındaki önemini belirlemiştir (Glowacki 1998). VEGF endotel hücreleri uyararak osteojenik faktörlerin sentezini sağlar ve kemik oluşumunu dolaylı yoldan artırır. Çok sayıda osteojenik faktörde VEGF üretimini uyarmaktadır. VEGF osteoblastların kemotaksitesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır (Street *et al.* 2002, Zelzer *et al.* 2002, Midy and Plouet 1994).

VEGF kemik onarımı sağlamak kontrollü salım sistemlerinde, gen terapi yöntemlerinde çeşitli formlarda kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntem VEGF'in biyopolimer yapıdan ortama salımının sağlanmasıdır (Şekil 3.28). Bununla hedeflenen, implant çevresindeki dokulardan kılcal damarların implant içine gelişmeleri ve kanlanmanın oluşmasıdır (Şekil 3.29).



Şekil 3.28 VEGF'nin polimer matriksten salımını



Şekil 3.29 VEGF kullanımı ile iskele malzemede damar oluşumu

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1 Madde ve Malzeme

Çalışmalarda, deneylerin yürütüldüğü ortam koşullara bağlı olarak hücre kültürü saflığında ve analitik saflıkta kimyasallar maddeler ve sarf malzemeleri kullanıldı.

Hücre iskelelerinin hazırlanmasında, poli(D,L-laktik-ko-glikolikasit) (85:15 PLGA; Sigma, St. Louis, MO, ABD), kitosan (Fluka; orta moleküler ağırlıklı) polimerleri ve hidroksiapatit (Tip-1; Sigma) seramiği kullanılmıştır.

In vitro hücre kültürü çalışmalarında DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma), α -MEM (*Modified Eagle's Medium*) (Sigma), DMEM-199 (Sigma), askorbik asit (Sigma), deksametazon (Sigma), sodyum β -gliserofosfat (Sigma), L-glutamin (Sigma), fetal sığır serumu (FBS) (Sigma), tuzlu fosfat tamponu (PBS) (Sigma) ve penisilin/streptomisin (Sigma) kullanıldı.

Örneklerin ve hücrelerin ışık mikroskopisi çalışmalarında, tespit amacıyla pH 7.4'e tamponlanmış % 10'luk formalin çözeltisi kullanıldı. Taramalı elektron mikroskobu çalışmalarında ise örnekler, kakodilat tamponunda (pH 7.4) hazırlanmış % 10'luk glutaraldehit çözeltisi ile tesbit edildi.

Histolojik çalışmalar için hematoksin-eosin (H&E) (Sigma), von Kossa ve Alizarin kırmızısı (AR-S) (Sigma) boyaları kullanıldı. İmmünohistokimya çalışmaları için poliklonal-antikor-osteopontin, poliklonal-antikor-ostenektin ve poliklonal-antikor-osteokalsin kullanıldı (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, ABD).

Vasküler endotelial büyüme faktörünü ve yeşil floresan protein kodyalan adenoviral vektör (Ad-VEGF-GFP) Dr. W. Lindenmeier'den (Braunschweig, Almanya) temin edildi.

4.2 İskelelerin Hazırlanması

4.2.1 Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) iskelelerin hazırlanması

PLGA iskeleler kalıba dökme ve poröjen arındırma tekniği ile hazırlandı. Polimer çözücüsü olarak diklormetan, poröjen olarak 250-300 µm tanecik boyutunda elenmiş NaCl kullanıldı. Bu amaçla, PLGA'nın diklormetan içerisinde % 15'lik polimer çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti, içerisinde poröjen olarak 25 g NaCl bulunan cam petriye döküldü. Buharlaşmanın ardından oluşan katı polimer içerisinde bulunan tuzun uzaklaştırılması amacıyla ılık saf su içerisine alındı. Tuz partiküllerinin yapıdan uzaklaştırılmasıyla 250-300 µm gözenek boyutuna sahip PLGA iskeleler hazırlanmış oldu.

4.2.2 PLGA iskelelerin mineralizasyonu

Hazırlanan PLGA iskeleler, iskele yüzeylerinde mineral oluşumunu sağlamak amacıyla SBF (*Simulated Body Fluid*) çözeltisinin (141mM NaCl; 4mM KCl; 0,5 mM MgSO₄.7H₂O; 2,5 mM CaCl₂.2H₂O; 1 mM KH₂PO₄; 1 mM MgCl₂.6H₂O; 50 mM TRİS; pH: 7.4) içerisinde 28 gün boyunca 37°C'da inkübe edildi. SBF çözeltisi dengeli iyon konstrasyonunu sağlamak amacıyla günlük olarak değiştirildi. SBF ile muamele sonrasında meydana gelen kütle değişimini belirlemek amacıyla iskelelerin kuru kütleleri belirli periyotlarda belirlendi. Kuru kütle artışı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Kütle artışı} = [(m_{k2} - m_{k1}) / m_{k2}] \times 100$$

m_{k1} : başlangıçtaki örneğin kuru kütle miktarı

m_{k2} : belirli zaman noktasında alınan örneğin kuru kütle miktarı

Ayrıca, SBF içerisinde inkübe edilen PLGA iskelelerin 7., 14., ve 28. günlerde iskele yüzeyinde hidroksiapatit oluşumunu belirlemek amacıyla FTIR spektrumları çekildi. Bu amaçla analizi yapılacak örnekler kurutulduktan sonra kütlelerinin yaklaşık yüz katı kadar kristal KBr (Sigma) ile karıştırılıp, agat havanda ince toz haline gelene kadar öğütüldüler; kontrollü olarak arttırılan basınç altında özel kalıplar arasında disk haline getirildiler. Örnekler Mattson 1000 marka (İngiltere) bir FTIR ile incelendi.

4.2.3 Kitosan/Hidroksiapatit (K/HA) iskelelerin hazırlanması

Kitosan/Hidroksiapatit iskeleler dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlandı. Polimer çözücüsü olarak asetik asit kullanıldı. Bu amaçla, kitosanın % 1'lik asetik asit çözeltisinde %2'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti içerisine 9/1(h/h) oranında fosfat tamponunda (pH 6.8) süspanse edilmiş hidroksiapatit ilavesi yapıldı. Homojen bir çözelti elde etmek amacıyla çözelti yaklaşık 12 saat karıştırıldı. Hazırlanan çözelti petrilere döküldü ve 30 dakika +4°C'da bekletildikten sonra -25°C'ye transfer edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ele geçen donmuş polimer çözeltisi oluşan buz kristallerinin yapıdan uzaklaştırılması amacıyla liyofilize edildi. Liyofilizasyon işleminden sonra ele geçen iskeleler 1 N NaOH ile muamele edildi. İki kez saf su ile yıkanan iskeleler sterilize edilmek üzere % 70'lik etanol içerisinde 12 saat bekletildi. Hazırlanan iskelelerin bir kısmı çalışmalarda saf olarak kullanılırken, bir kısmı da yeşil floresan protein (*Green Fluorescent Protein*, GFP) ve VEGF sentezleyen adenoviral vektör (Ad-GFP-VEGF) ile aktive edildikten sonra kullanıldı.

4.2.4 Kitosan/Hidroksiapatit iskelelerin Ad-GFP-VEGF ile aktivasyonu

1000 MOI, 500 MOI ve 100 MOI Ad-GFP-VEGF içeren tuzlu fosfat tamponu kuru kitosan/hidroksiapatit iskele yüzeyine damlatıldı. İskelelerin DNA ile etkileşimi sağlamak amacıyla DNA içeren iskeleler 4°C'da bir gece bekletildi ve iskeleler tekrar liyofilize edildi.

4.3 Hücre Kaynakları

Bu çalışmada; primer sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (MKH), fare MC3T3-E1 hücre dizisi ve primer insan osteoblastları (*human OsteoBlast*, hOB) olmak üzere 3 farklı hücre kaynağı kullanıldı. MC3T3-E1 ve hOB hücreleri Albert-Ludwig Üniversitesi (Freiburg, Almanya) araştırma laboratuvarından temin edilirken, kemik iliği mezenkimal kök hücreler laboratuvarlarımızda yetiştirilen Wistar soyu genç sıçanların femurlarından izole edildi.

4.3.1 Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve kültürü

Kemik iliği mezenkimal kök hücreler, 200-250 g ağırlığındaki Wistar soyu genç sıçanların femurlarından izole edildi. İçerisinde 5 mL DMEM içeren 25G' lik şırınga iğnesi yardımıyla kemik iliği hücreleri 15 mL' lik falcon tüplere aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1100 devir/dakika'da 10 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra çözeltinin üst kısmı atıldı. Yıkama işleminin ardından hücreler 50 mg/mL askorbik asit, 10 mM Na-β-gliserofosfat, 10^{-8} M dekzametazon, % 10 fetal sığır serumu (*fetal bovine serum*, FBS), penisilin-streptomisin içeren DMEM içerisinde yeniden süspanse edilerek 37°C'da, % 5 CO₂, % 95 hava, % 90 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Üçüncü günde yapışmayan hücreler besiyeri değiştirilerek uzaklaştırıldı. Takip eden günlerde besiyeri haftada 3 kere değiştirildi.

4.3.2 MC3T3-E1 ve hOBs hücrelerinin kültürü

MC3T3-E1 hücreleri 50 mg/mL askorbik asit, 10 mM Na-β-gliserofosfat, 10^{-8} M dekzametazon, % 10 FBS, penisilin-streptomisin içeren α-MEM içerisinde 37°C'da, % 5 CO₂, % 95 hava, % 90 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi.

hOBs hücreleri ise % 10 FBS, penisilin-streptomisin içeren DMEM-199 içerisinde 37°C'da, % 5 CO₂, % 95 hava, % 90 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi.

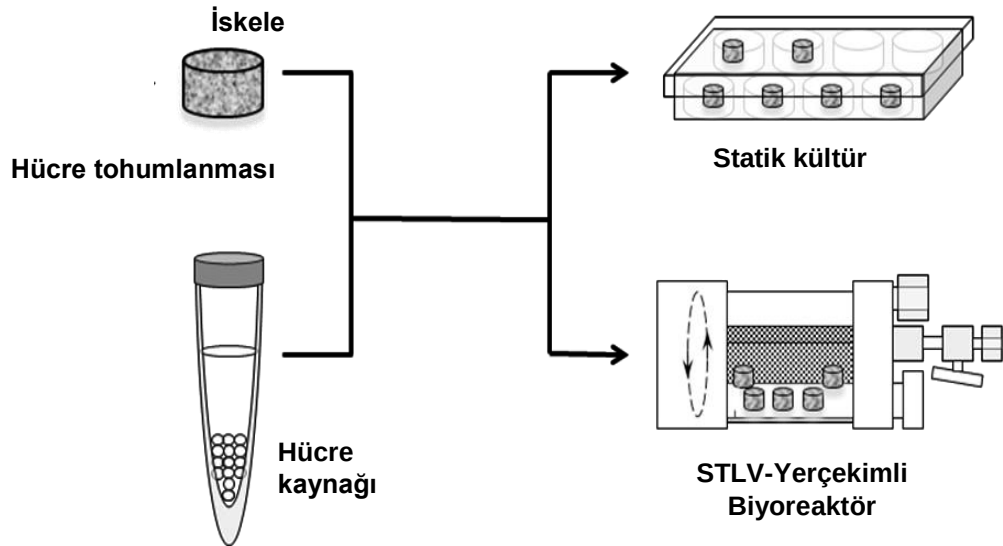
4.4 Polimer İskelelerin Sterilizasyonu ve Kùltür İçin Hazırlanmaları

Tohumlama işleminden önce PLGA iskeleler % 70'lik etanol içeren tüp içerisinde aksiyel karıştırıcının üzerinde bir gece bekletildi. Polimer iskeleler, etanolu yapılarından uzaklaştırmak amacıyla steril PBS ile yıkandı. Daha sonra PLGA iskeleler hücresel tutunmayı artırmak amacıyla % 20 serum içeren besiyeri ile 4-5 saat muamele edildi.

K/HA iskeleler ise %70'lik etanol içerisinde bekletildikten sonra, UV ışık altında (241 nm; 3 saat) bekletildi.

4.5 Hücrelerin İskelelere Tohumlanması

Hücreler mineralize PLGA ve K/HA iskelelerin yüzeyine statik ve/veya dinamik yöntemlerle tohumlandı (şekil 4.1). alışmalar 4 farklı deney grubu üzerinden yürütüldü (izelge 4.1).



şekil 4.1 İskele yüzeylerine hücre tohumlama yöntemlerinin şematik gösterimi

Kemik iliği mekenzimal kök hücreleri mineralize PLGA yüzeyine, MC3T3-E1 hücreleri saf K/HA yüzeyine, hOB hücreleri ise saf ve aktive edilmiş K/HA yüzeyine tohumlandı.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan deneysel gruplar

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
İskele	Mineralize PLGA	K/HA	K/HA	Adenoviralle aktive edilmiş K/HA
Hücre	MKH	MC3T3-E1	hOB	hOB

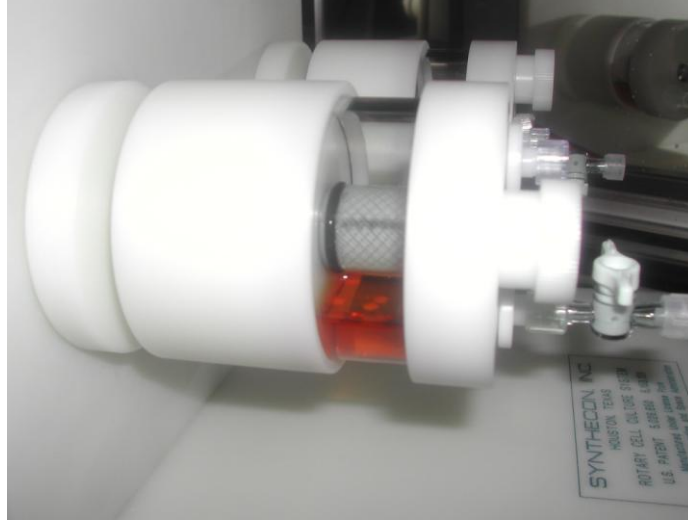
4.5.1 Statik tohumlama

Besiyerinde ıslatma işleminin ardından iskeleler, 24-kuyucuklu petri içerisine yerleştirildi ve her birinin üzerine 100 µL hücre süspansiyonu (5×10^5 hücre/iskele) ilave edildi. Hücresel adezyonun gerçekleşebilmesi için petri aksiyel karıştırıcın üzerinde 2 saat karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Bu işlemin ardından iskelelerin bulunduğu kuyucuklara 2 mL besiyeri ilave edilerek inkübasyona devam edildi. 28 gün süren *in vitro* kültür işleminlerinde besiyeri iki günde bir değiştirildi. Belirli zaman noktalarında iskeleler immünohistokimya ve taramalı elektron mikroskobu (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) analizleri için uygun yöntemlerle tesbit edildi.

4.5.2 Dinamik tohumlama

Dinamik tohumlama işleminde RCCS (*Rotary Cell Culture System*) olarak tanımlanan hücre kültürü biyoreaktör sistemi kullanıldı (Şekil 4.2). İskeleler STLV (*Slow Turning Lateral Vessel*) biyoreaktörü olarak adlandırılan kültür kabının içerisine yerleştirildi ve 400 µL hücre süspansiyonu (5×10^5 hücre/iskele) eklendi. Hücresel adezyonunun gerçekleşmesi için toplam 2 saat karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Her yarım saatte bir biyoreaktörlerin içerisine 1 mL besiyeri ilave edildi. Bu sürenin sonunda biyoreaktörlerdeki toplam hacim 25 mL'ye tamamlandı. Kültür işleminlerinde besiyeri

iki günde bir değiştirildi. Belirli zaman noktalarında iskeleler immünhistokimya ve SEM analizleri için uygun şekillerde tesbit edildi.



Şekil 4.2 İçerisinde mezenkimal hücre tohumlanmış mineralize PLGA iskelelerin kültürünün yürütüldüğü STLV biyoreaktörünün görünümü

4.6 Histoloji (Işık Mikroskopisi)

In vitro deneylerde kullanılan örnekler belirli zaman noktalarında eksplante edilip, histoloji analizleri için %10'luk formaldehit içeren fosfat tamponunda (pH 7.4, 0.1M) tesbit edildi. Standart histolojik işlemler (dehidrasyon, parafine gömme ve kesit alma) sonrası hematoksilin ve eosin (H&E) (Sigma), alizarin kırmızısı S (AR-S) ve von Kossa ile boyanıp Nikon marka (Japonya) ışık mikroskopunda incelendi.

4.6.1 Hematoksilin ve Eosin boyaması (H&E)

H&E boyaması için örnekler;

1. Deparafinize edildi (Kriyostat ile kesitleri alınan örnekler için bu basamak atlandı).
2. 2-3 dk hematoksilin ile muamele edildi.
3. Hematoksilini uzaklaştırmak için 8 dk akar su altında yıkandı.

4. 2 dk eosin ile muamele edildi.
5. Alkol serilerinden geçirildi (% 70, % 85,% 95 ve % 100).
6. Ksilol ile muamele edildi.
7. Işıık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

4.6.2 Alizarin kırmızısı (AR-S)

AR-S boyaması için iskele ve hücre-iskele yapıları;

1. 10 dk 40 mM AR-S ile aksiyel karıştırıcı üzerinde bekletildi.
2. Boyanın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla 5 defa su ile yıkandı.
3. Spesifik olmayan AR-S boyasını ortamdan uzaklaştırmak için 15 dk PBS yıkandı.
4. Işıık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

4.6.3 Von Kossa boyaması

Von Kossa boyaması için örnekler,

1. Deparafinize edildi (Kriyostat ile kesitleri alınan örnekler için bu basamak atlandı).
2. 20 dk %5 lik AgNO₃ ile muamele edildi.
3. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
4. 2 dk 5 g Na₂CO₃ + 75 mL saf su + 25 mL formalin çözeltisi ile muamele edildi.
5. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
6. 2 dk 5 sodyumtiyosülfat ile fikzasyon yapıldı.
7. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
8. 2-3 dk hemotoksilin ile muamele edildi.
9. Saf su ile dikkatlice yıkandı.
10. Işıık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

4.7 İmmünohistokimya

In vitro deneylerde kullanılan örnekler, 7 günlük periyotlarla % 10'luk formalin içerisinde tesbit edildi. Tesbit işleminin ardından örnekler tesbit çözeltisini ve diğer kirlilikleri uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından örnekler etanol serilerinden (% 50, % 70, % 80, % 90 ve % 95) geçirilerek dehidrate edildi (Mineralize PLGA içeren örnekler dehidrasyon işleminden önce 0.5 M HCl içerisinde 30 dakika bekletildi). Bu işlemin ardından örnekler parafin içerisine gömülerek bloklandı ve 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. İmmünohistokimya boyamaları için standart avidin-biyotin kompleks peroksidaz tekniği kullanıldı.

Bu amaçla örnekler,

1. Saf su ile yıkandıktan sonra, 70°C'da 30 dakika deparafinizasyon işlemi için bekletildi (Kriyostat ile kesitleri alınan örnekler için bu basamak atlandı).
2. 15 dk H₂O₂ çözeltisi ile muamele edildi.
3. PBS ile yıkandı.
4. Primer antikoruyla 60 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. PBS ile yıkandı.
6. Biotinlenmiş keçi-anti-fare sekonder antikoru ile 10 dk inkübe edildi.
7. PBS ile yıkandı.
8. Streptavidin-Peroksidaz ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. PBS ile yıkandı.
10. AEC kromojen-AEC substrat karışımı ile 5-10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. Saf su ile yıkandı.
12. Işık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

4.8 SEM

SEM incelemeleri için örnekler sodyum kakodilat tamponunda (pH 7.4) hazırlanmış % 10'luk glutaraldehit ile tesbit edildi. Tesbit işleminin ardından örnekler fiksatif ve diğer

kirlilikleri uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından örnekler etanol serilerinden(%50, %70, %80, %90 ve %95) geçirilerek dehidrate edildi ve Jeol-JSM model taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendi.

4.9 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi

İskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerin belirli zaman noktalarındaki mitokondriyel dehidrogenaz aktivitesi, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] kiti kullanılarak belirlendi.

Bu amaçla belirli zaman noktalarında alınan 2-3 mm³ lük hücre tohumlanmış iskele 96-kuyucuklu petri kabına konuldu. Petrinin içerisine 30 µL MTT çözeltisi ve 270 µL serumsuz besiyeri ilave edildi ve örnekler 4 saat boyunca karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Bu sürenin sonunda oluşan formazan kristallerinin fotoğrafları çekildi.

4.10 Konfokal Lazer Mikroskopisi (*Confocal laser scanning microscopy*, KLM)

KLM hücrelerin iskele içerisine dağılımlarını ve GFP (*green flouresans protein*) ekspresyonlarını belirlemek amacıyla kullanıldı. Bu amaçla, örnekler PBS ile yıkandıktan sonra PKH-26 (Sigma) ile işaretlendiler. Bu çalışma 3. ve 4. gruptaki örnekler için yapıldı.

4.11 VEGF salımı

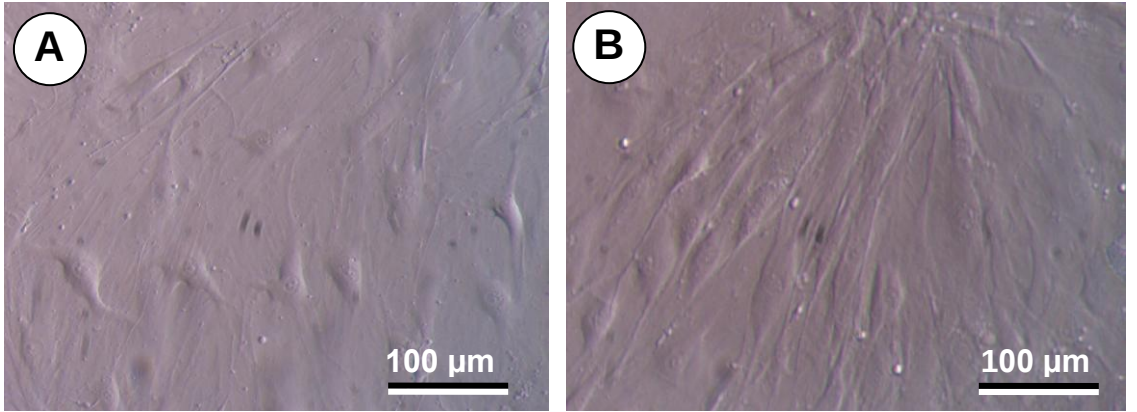
DNA ile aktive edilmiş iskele yüzeyindeki hücrelerin (4.grup) ürettiği hVEGF, hVEGF ELISA kiti (Sigma) kullanılarak belirlendi. Deneyden 24 saat önce vasat, taze vasat ile değiştirildi. Ertesi gün çözelti VEGF analizi için toplandı. Bu çalışma 1000 MOI içeren örnek için 3., 5., 7., 9., 11., ve 13. günlerde yapılırken; 100 MOI, 500 MOI ve 1000 MOI içeren örnekler için 3. günde gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

5.1 Mineralize PLGA İskelelerle İlgili Araştırma Bulguları (1.Grup)

5.1.1 Faz kontrast mikroskobu bulguları

Sıçan kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler 11-12 gün içerisinde bolluğa (*confluence*) ulaştığı belirlendi. Şekil 5.1’de görüldüğü gibi kültürün 10. gününde hücrelerin büyük bir çoğunluğu iğ şeklinde bir morfolojiye sahipken, bazı hücreler küresel morfolojiye sahiptir (Şekil 5.1). Hücreler ilk pasaj sonrasında 6-7 gün gibi daha kısa sürelerde bolluğa ulaşmaktadırlar. Pasajlanan hücreler daha yoğun bir şekilde bir araya gelmiş ve tamamen iğ şeklinde bir morfolojiye sahip olmuştur.

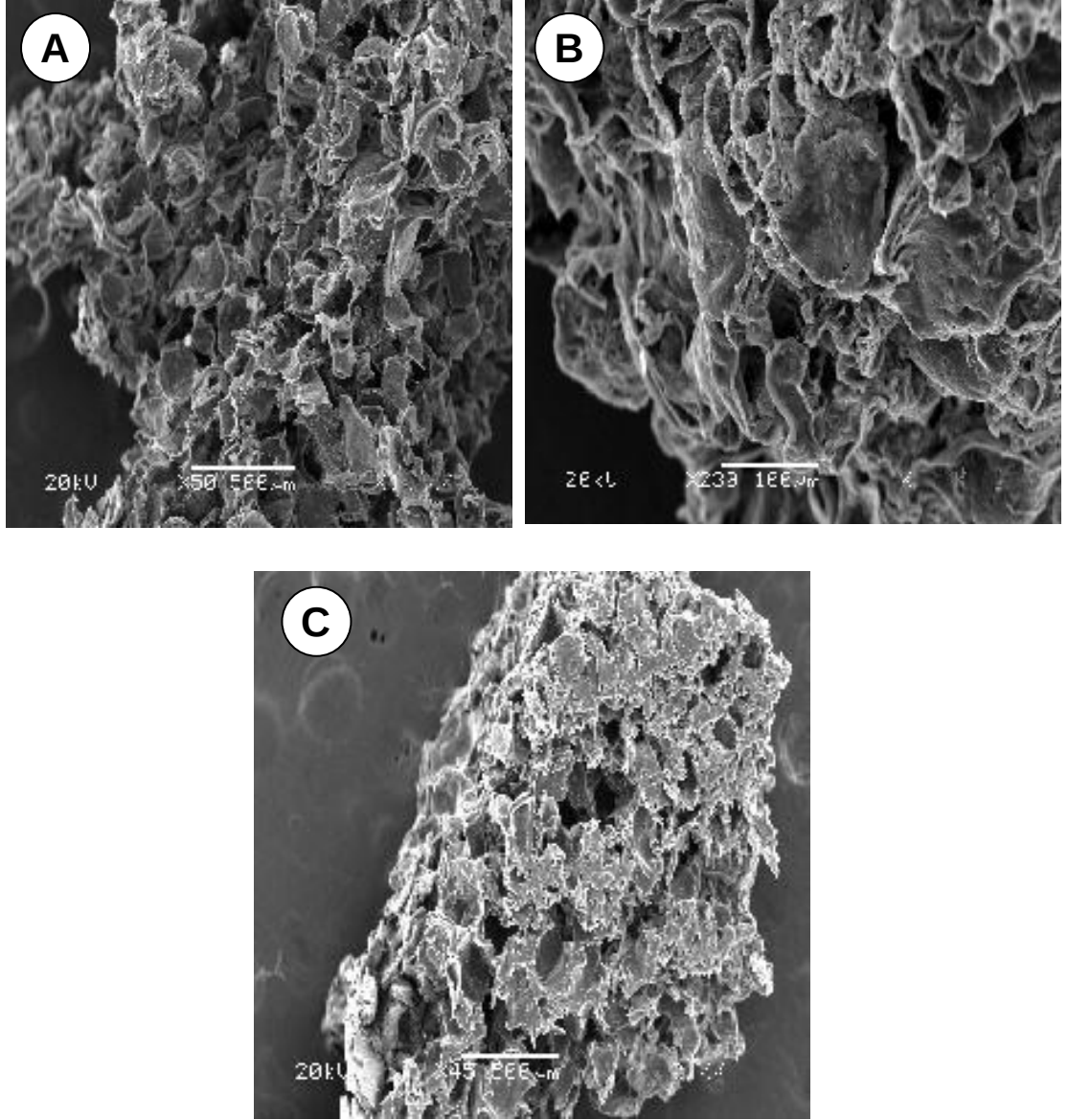


Şekil 5.1 Mezenkimal kök hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüsü

A.10. gün, B.3. pasaj

5.1.2 SEM bulguları

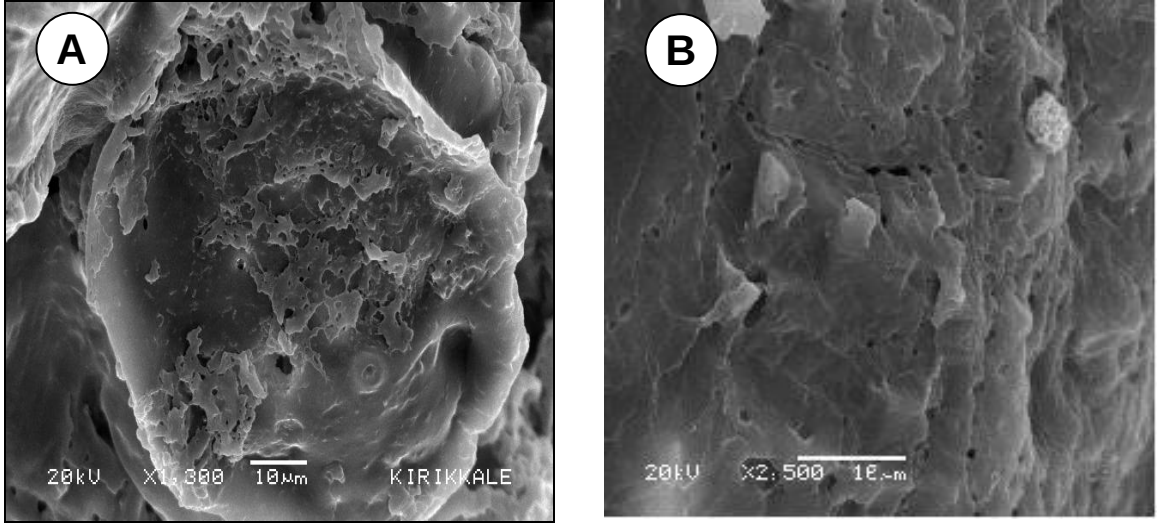
SEM incelemesi PLGA iskelelerin birbirleriyle bağlantılı gözenekler içeren makroporöz yapıya sahip olduklarını gösterdi (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 PLGA iskelelerin SEM mikrografları

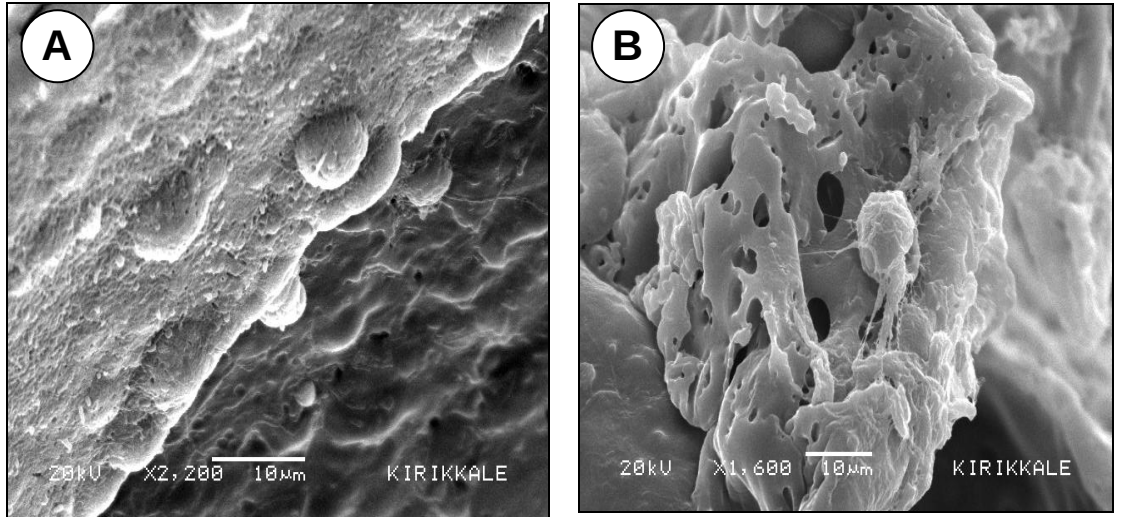
A. Yüzey görüntüsü; B yüzey görüntüsü, C iç kesit görüntüsü

SBF içerisinde bekletilen PLGA iskelelerin yüzeylerinde çok sayıda ince tabakalar şeklinde mikropartiküllerin biriktiği belirlendi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 PLGA yüzeyinde SBF ile inkübasyon sonrası oluşan mineral plakların SEM görüntüleri

İskelelerin orijinal yapı ve boyutlarını deneyler süresince koruduğu belirlendi. SEM fotoğrafları ayrıca hücrelerin iskele yüzeyine bağlandığını ve psödopodları ile mineralize iskele yüzeyinde yayıldığını göstermektedir (Şekil 5.4).



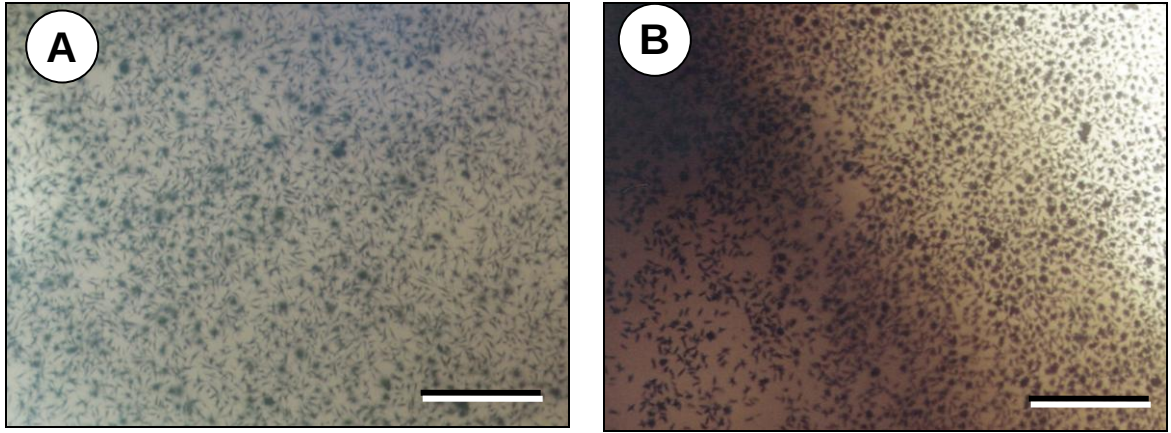
Şekil 5.4 Mezenkimal kök hücre tohumlanmış mineralize PLGA iskelelerinin SEM görüntüleri

A. Hücrelerin yüzeye adezyonu, B. Hücrelerin psödopodları vasıtasıyla iskele yüzeyine yayılması

5.1.3 MTT bulguları

MTT reaktifinin etkisiyle oluşan formazan kristalleri çok sayıda hücrenin mineralize iskele yüzeyine bağlandığını ve hücrelerin mitokondriyel aktivitelerini deneysel çalışmalar boyunca sürdürdüğünü göstermiştir. STLV biyoreaktörde kültürü yapılan hücrelerin statik ortamda kültürü yapılan hücelere kıyasla yüksek oranda formazan kristali oluşturdıkları Şekil 5A ve 5B’de görülmektedir. Biyoreaktörde kültüre edilen hücrelerin yüksek oranda mitokondriyel aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Faz kontrast görüntüleri incelendiğinde dinamik hücre tohumlanmasının statik tohumlamaya kıyasla daha homojen hücresel dağılıma yol açtığı belirlendi (Şekil 5.5).



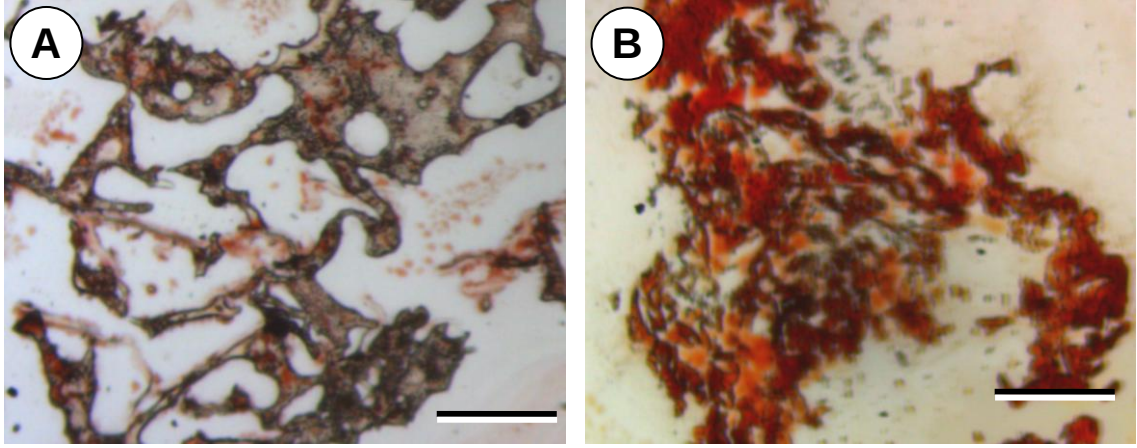
Şekil 5.5 Mezenkimal hücre tohumlanmış iskelelerin 14. gündeki MTT boyamaları

A. Statik kültür, B. Dinamik kültür. Boyut çubuğu 200 µm

5.1.4 İmmünohistokimya bulguları

İmmünohistokimya, önemli bir kemikleşme işaretçisi olan osteopontin için yapıldı. Işık mikroskopuyla alınan fotoğraflar incelendiğinde, dinamik kültürün kemik oluşumunda

pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Dinamik ortam koşullarında kültüre edilen iskelelerin statik ortam koşullarında kültüre edilen iskelelere oranla daha yüksek oranda Anti-Osteopontin boyanması gözlemlendi (Şekil 5.6).

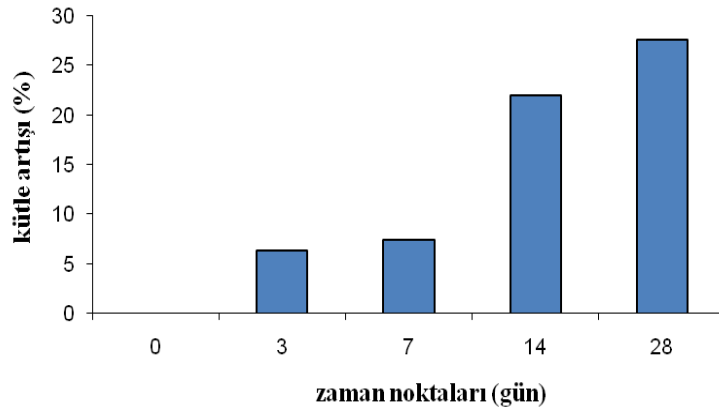


Şekil 5.6 Mezenkimal kök hücre tohumlanmış iskelelerin 28. günde Anti-Osteopontin antikoru boyamaları. Boyut çubuğu 200 µm

A. Statik kültür, B. Dinamik kültür

5.1.5 Kütle artışı bulguları

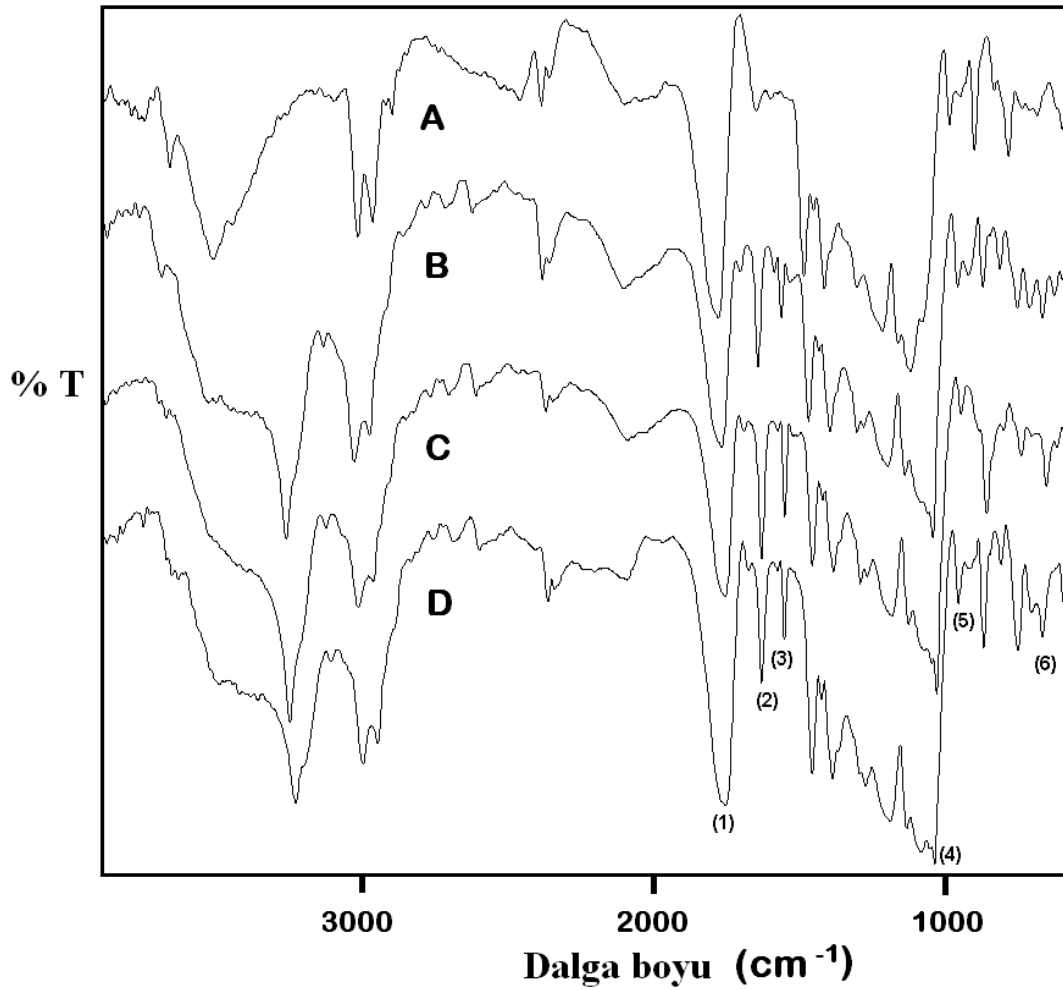
SBF ile muamele sonrasında meydana gelen kütle değişimini belirlemek amacıyla iskelelerin kuru kütleleri 7., 14., ve 28. günlerde belirlendi. SBF içerisinde bekletilen PLGA iskelelerin kütleleri inkübasyon süresine paralel bir şekilde artmıştır (Şekil 5.7).



Şekil 5.7 SBF içerisinde mineralize edilen PLGA iskelelerinde zamana bağlı kütle artışı

5.1.6 FTIR bulguları

SBF içerisinde bekletilen PLGA iskelelerin 7., 14., ve 28. günlerde çekilen FTIR spektrumları Şekil 5.8’de gösterilmektedir. Spektrumlarda CO_3^{2-} bantları 1629, 1552, ve 868 cm^{-1} ’de gözlemlenirken, PO_4^{3-} bantları 1037, 955, 598, ve 450 cm^{-1} ’lerde gözlemlenmektedir. C-O bant yoğunluğunun SBF içerisindeki inkübasyon süresiyle arttığı belirlendi (Şekil 5.8).

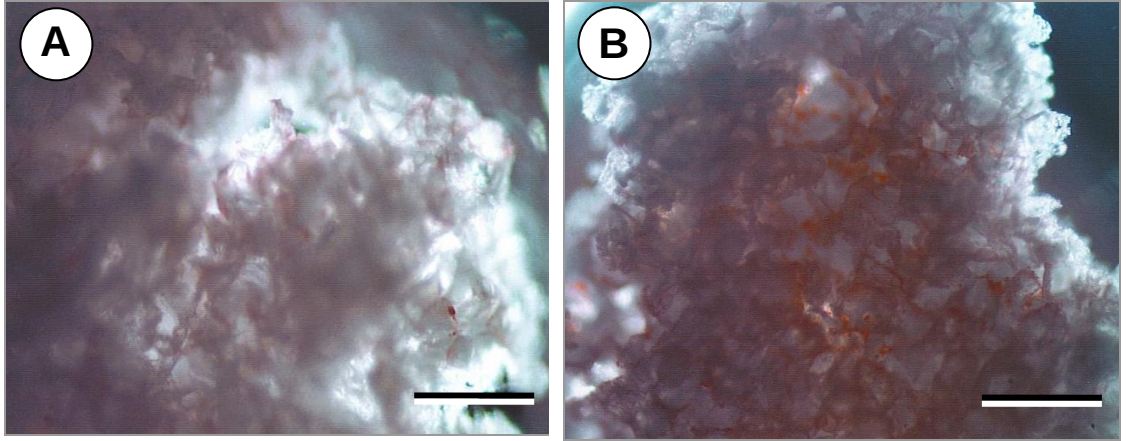


Şekil 5.8 Mineralize PLGA iskelelerin SBF ile inkübasyon sonrası elde edilen FTIR spektrumları

A. Saf PLGA, B. 7. gün, C. 14. gün, D. 28. gün

5.1.7 Alizarin kırmızısı bulguları

Hücre-iskele ve iskele yapılarının AR-S boyamaları Şekil 5.9’da görülmektedir. SBF ile muamele edilen PLGA iskele yüzeyinde kalsiyum içeriğinden dolayı belirli oranda AR-S boyası ile boyanmıştır. Bu boyanmanın yoğunluğu hücre-iskele yapılarındaki boyanmanın yoğunluğuna kıyasla oldukça düşüktür (Şekil 5.9).

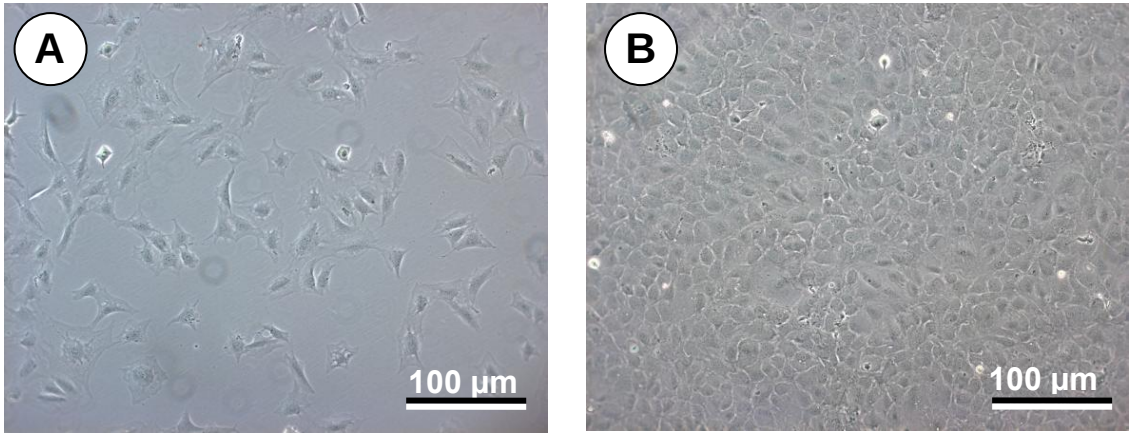


Şekil 5.9 A. Mineralize iskelenin AR-S boyaması. Boyut çubuğu 200 μm
B. Mezenkimal kök hücre tohumlanmış iskelenin AR-S boyaması

5.2. Kitosan/Hidroksiapatit iskelelerle ilgili araştırma bulguları (2., 3. ve 4.Grup)

5.2.1 Faz kontrast mikroskobu bulguları

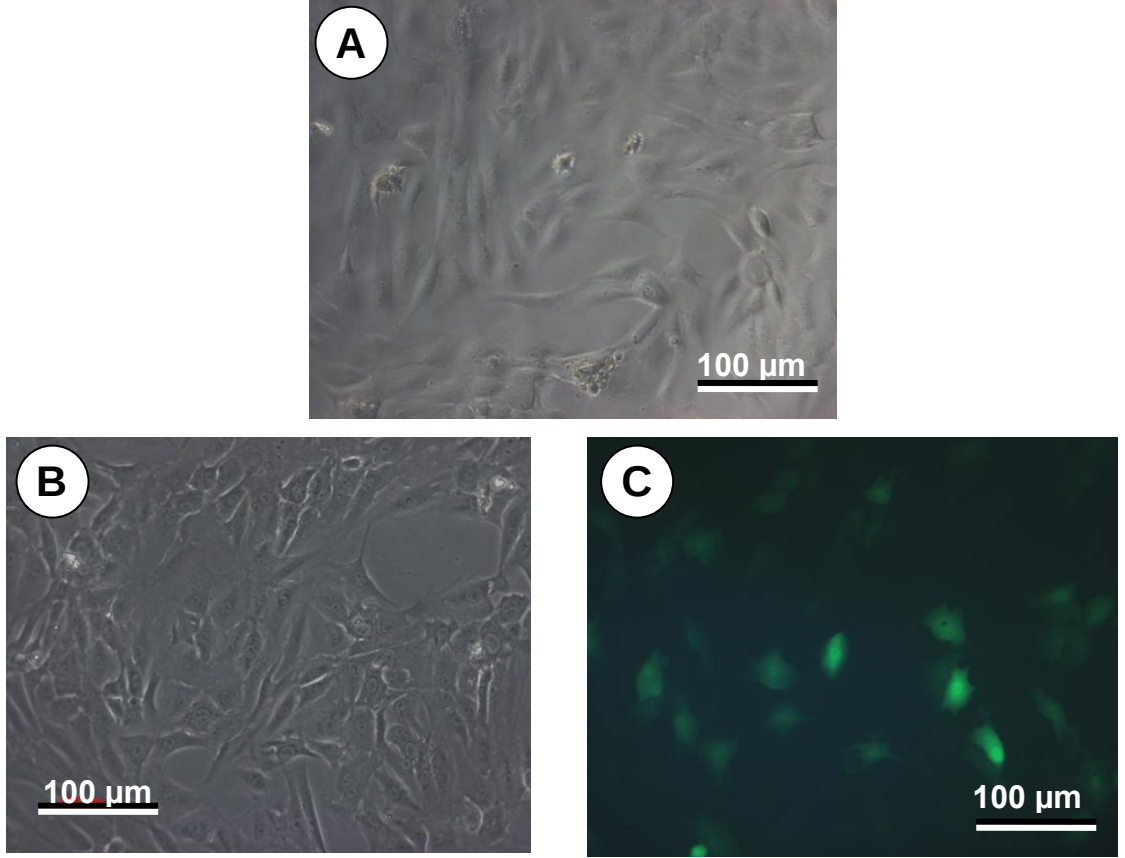
Şekil 5.10'da kültür kabına tohumlanan MC3T3-E1 hücrelerinin 2.saatteki ve 5. gündeki faz kontrast mikroskobunda çekilen fotoğrafları gösterilmektedir. Başlangınçta iğ ve küresel morfolojiye sahip olan MC3T3-E1 hücreleri, 5. günde küresel bir morfolojiye sahip olmuşlardır.



Şekil 5.10 MC3T3-E1 hücrelerinin faz kontrast mikroskobu görüntüsü

A. 2. saat, B. 5. gün

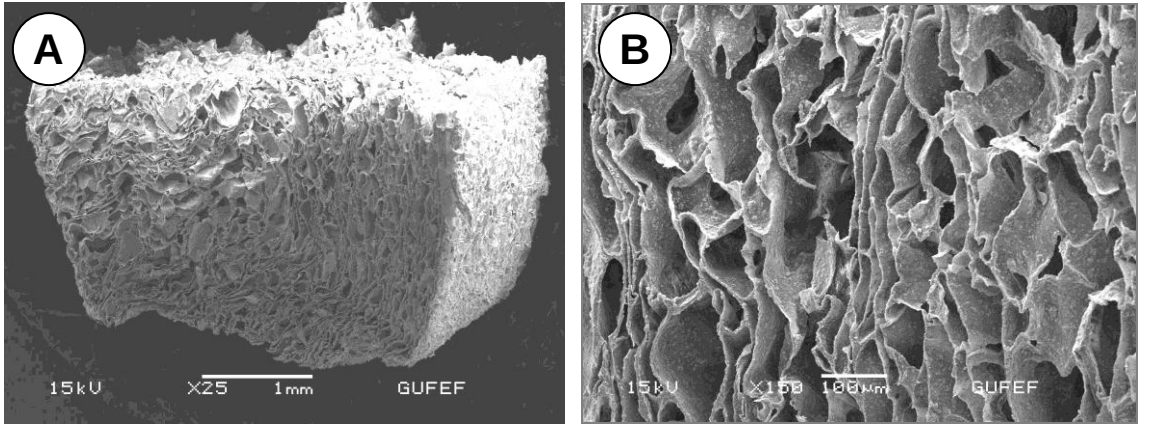
Şekil 5.11 A'da kültür kabına tohumlanan insan osteoblastı hücrelerinin (hOBs) 2.günde faz kontrast ve floresan mikroskoplarında çekilen fotoğrafları gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü gibi hücreler bir kısmı iğ şeklinde bir morfolojiye sahipken, büyük çoğunluğu küresel morfolojiye sahiptir. Hücrelerin bir kısmı hücrelerin adenoviral ile etkileşimleri belirlemek amacıyla Ad-GFP-VEGF ile transfecte edildi. Şekil 5.11 B'de hücrelerin faz kontrast mikroskobundaki, Şekil 5.11 C'de floresan mikroskobundaki görüntüsüdür. Kalitatif olarak hücrelerin % 35 oranında transfecte olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 5.11 A. hOB hücrelerinin 2.gündeki faz kontrast mikroskobu, B,C. Transfekte edilen hOB hücrelerinin 2.gündeki faz kontrast mikroskobu ve floresan mikroskobu görüntüsü

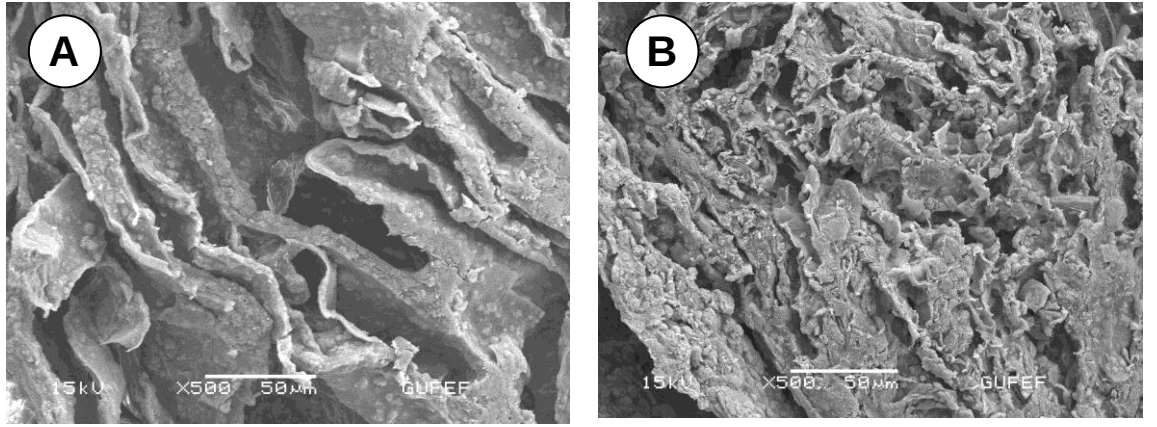
5.2.2 SEM bulguları

SEM incelemesi K/HA iskelelerin birbirleriyle bağlantılı gözenekler içeren makroporöz yapıya sahip olduklarını gösterdi HA partikülleri iskelelerin gözenek duvarlarının pürüzlü olmasına yol açmıştır (Şekil 5.12 A, B).



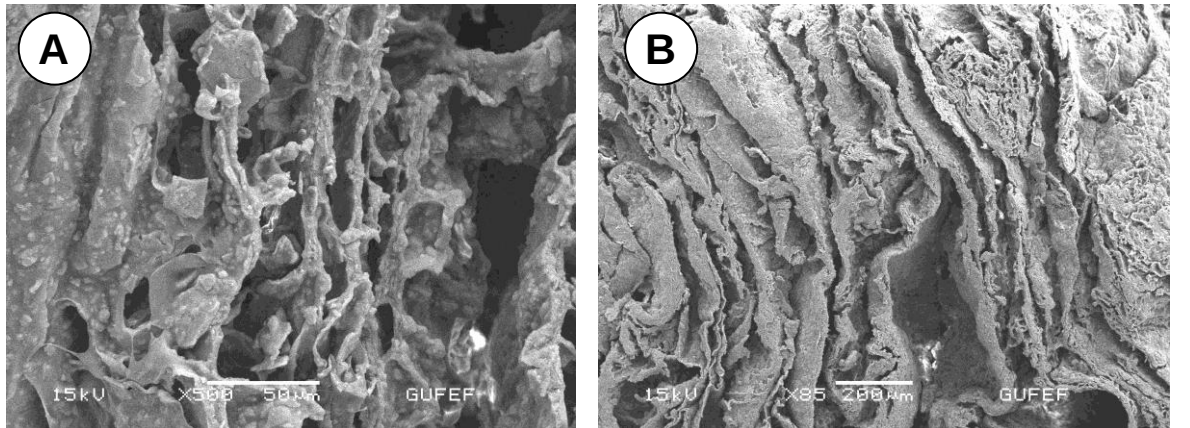
Şekil 5.12 K/HA iskelelerin SEM mikrografları

A, B iskele yüzey görüntüsü



Şekil 5.13 hOB hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin SEM mikrografları

A. 7. gün, B. 21. gün



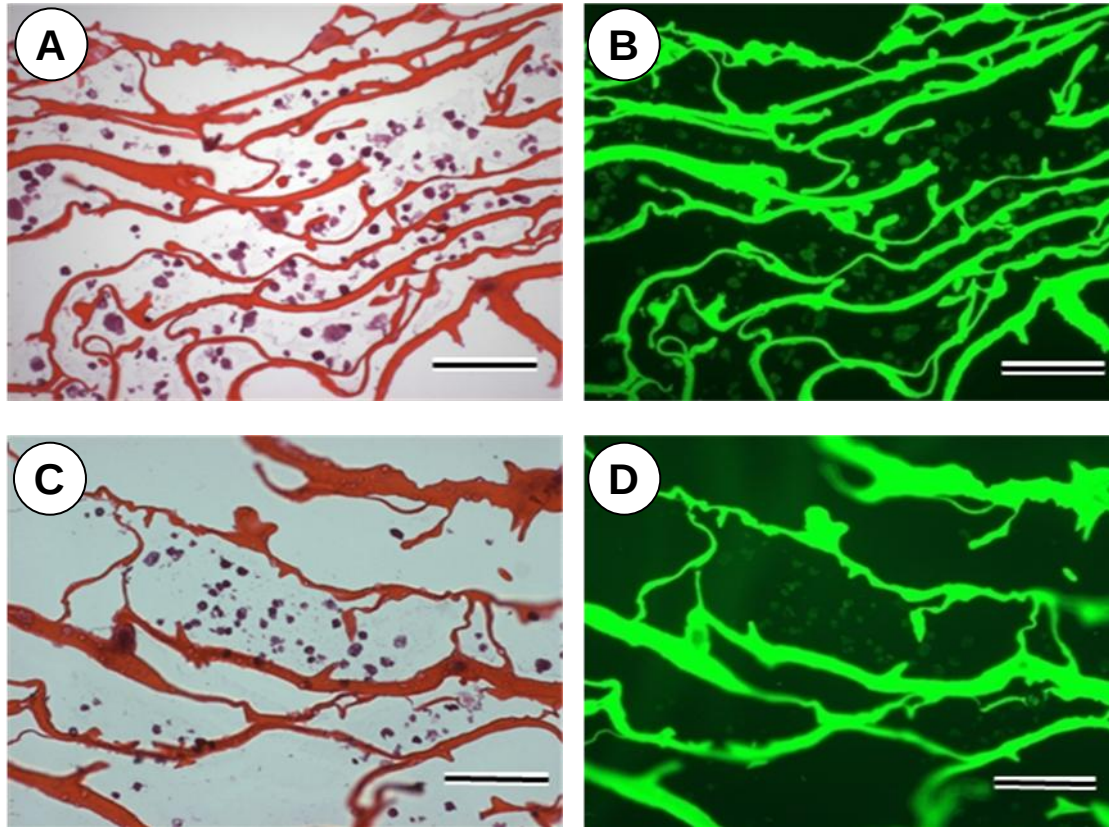
Şekil 5.14 MC3T3-E1 hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin SEM mikrografları

A. 7. gün, B. 21. gün

Şekil 5.13 ve 5.14, hOB ve MC3T3-E1 hücrelerinin iskele duvarlarına çok iyi bir şekilde tutunduğunu ve 21 günlük sürenin sonunda iskele yüzeyini tamamen kapladığını göstermektedir. hOB hücreleri için çekilen KLM mikrograflarında elde edilen sonuçları desteklemektedir (Şekil 5.23)

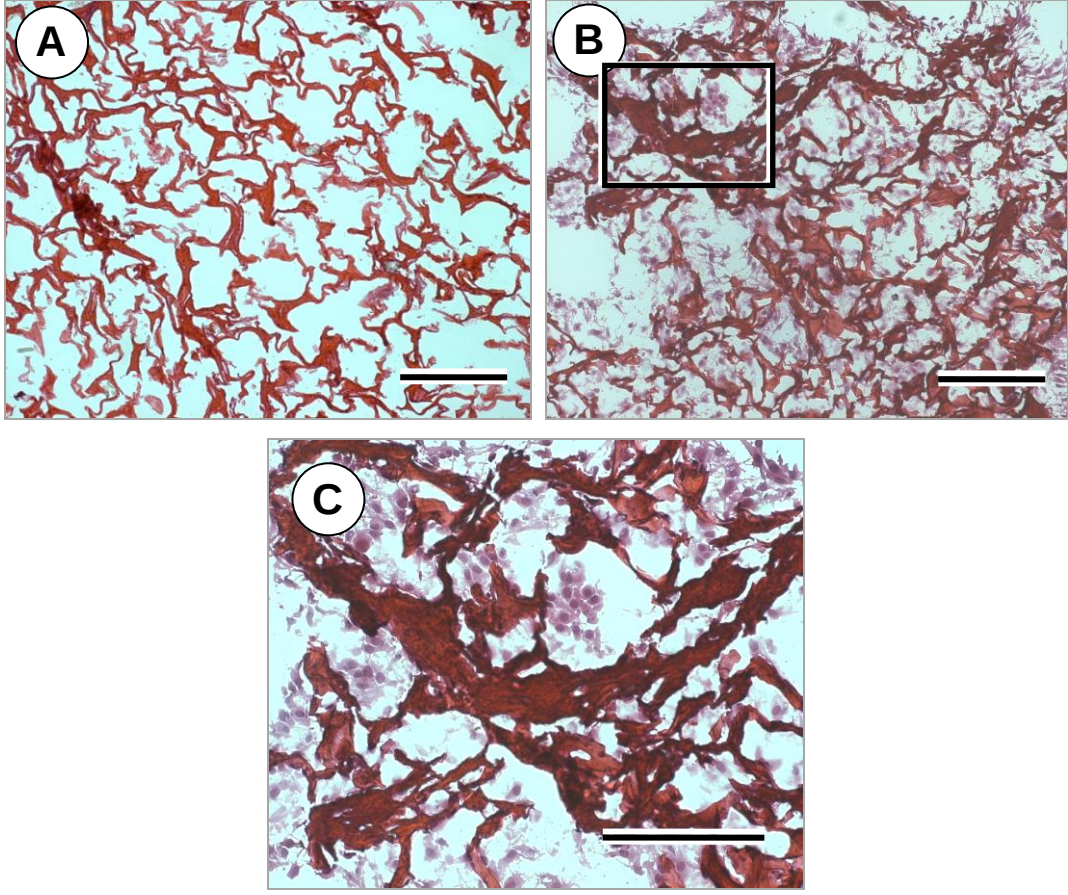
5.2.3 Histoloji bulguları

Histolojik bulgular MC3T3-E1 ve hOB hücrelerinin iskele yüzeyine yayıldığı ve çoğalarak gözenekleri zamanla doldurduğunu göstermektedir (Şekil 5.15 ve 5.16). Hücrelerin iskele yüzeyindeki dağılımını homojendir. Hücre dışı matriks bileşenlerinin oluşumu 7. günden 21. güne doğru beklenildiği gibi artmıştır (Şekil 5.15 ve 5.16).



Şekil 5.15 hOB hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin günlerdeki ışık ve floresan mikroskopu altındaki H&E boyamaları. Boyut çubuğu: 150 μ m

A, C. 7. gün; B, D. 14. gün.

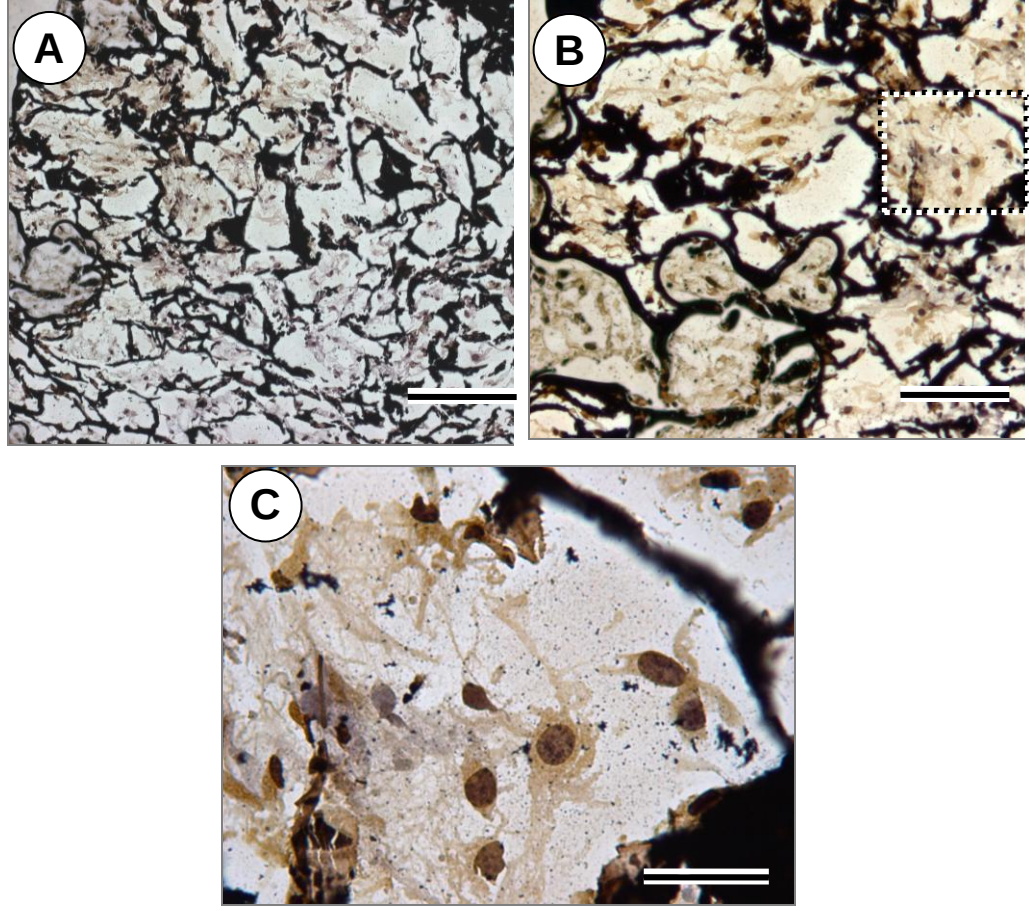


Şekil 5.16 MC3T3-E1 tohumlanmış K/HA iskelelerin H&E boyamaları

A. 7. gün; B, C. 21. Gün. Boyut çubuğu: 150 μ m

5.2.4 Von Kossa bulguları

Von Kossa boyamaları MC3T3-E1 tohumlanan K/HA iskeleleri için yapıldı (2. Grup). Histolojik bulgular, mineralizasyonun 14. günde gerçekleştiğini ve ilerleyen zaman noktalarında giderek arttığını göstermiştir (Şekil 5.17). İskelelerde hidroksiapatit içeriklerinden dolayı belirli oranda siyaha boyanmışlardır.

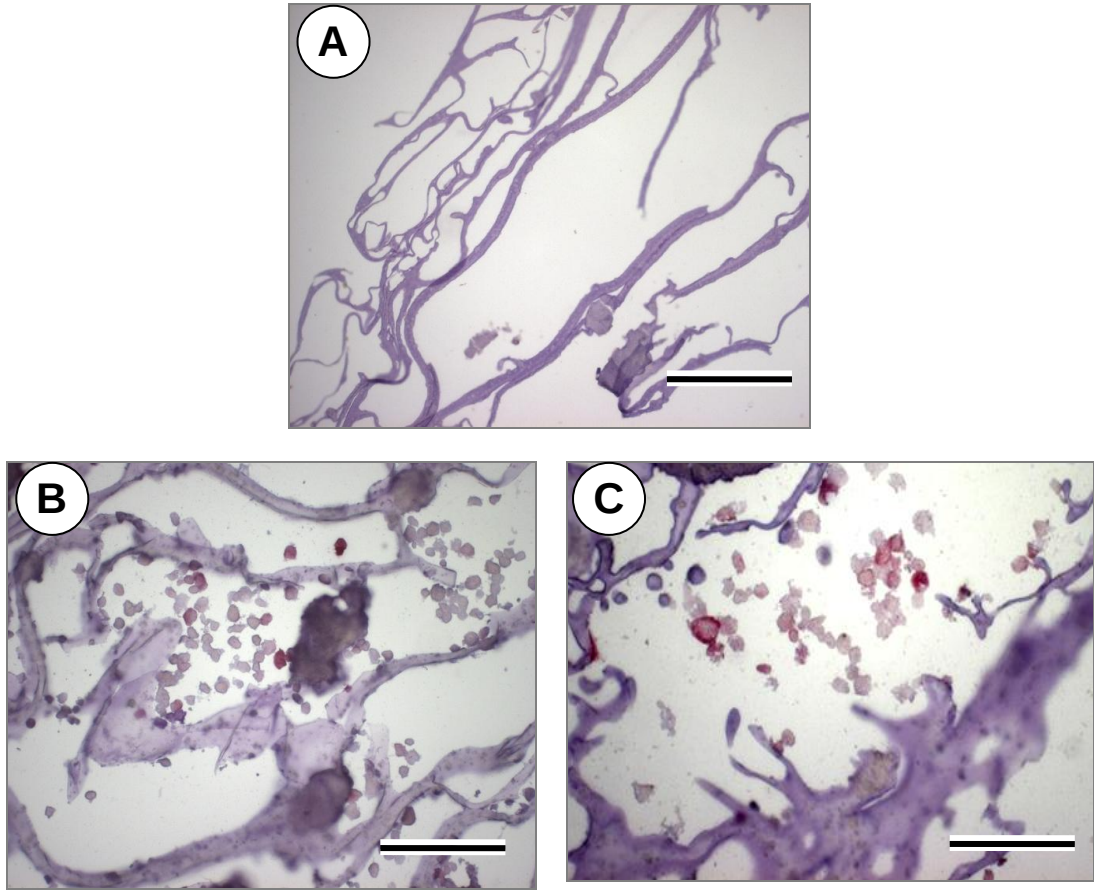


Şekil 5.17 MC3T3-E1 tohumlanmış K/HA iskelelerin 21. gündeki von Kossa boyaması.

Boyut çubuğu: A. 400 μm , B. 200 μm , C.100 μm

5.2.5 ALP bulguları

ALP boyamaları hOBs tohumlanan saf ve aktive edilmiş K/HA iskeleleri için yapıldı (3. ve 4. grup). Elde edilen bulgular, hücrelerin 7. günden başlayarak artan ALP aktivitesi gösterdiğini ortaya koydu (Şekil 5.18).

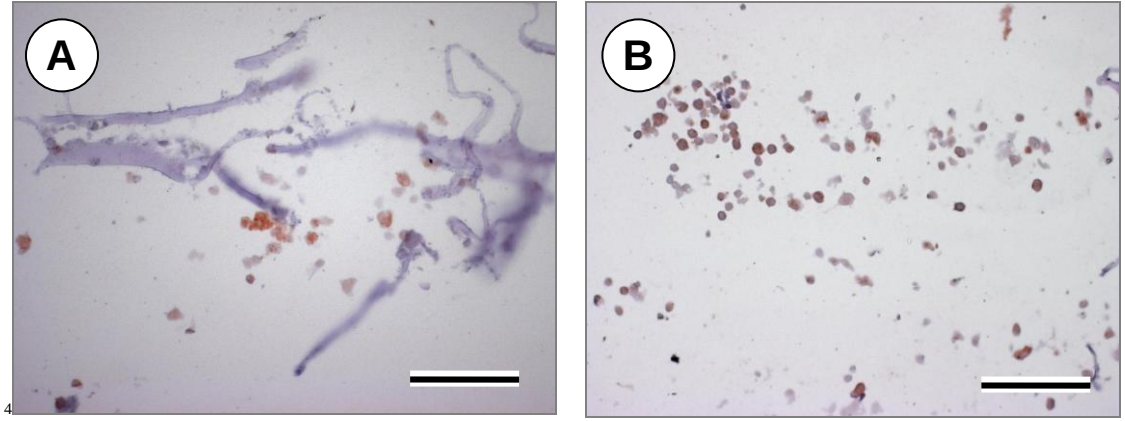


Şekil 5.18 K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hOB hücrelerinin ALP boyamaları

A. kontrol grubu (hüresiz). B. 7 gün, C. 14 gün. Boyut çubuğu: 150 µm

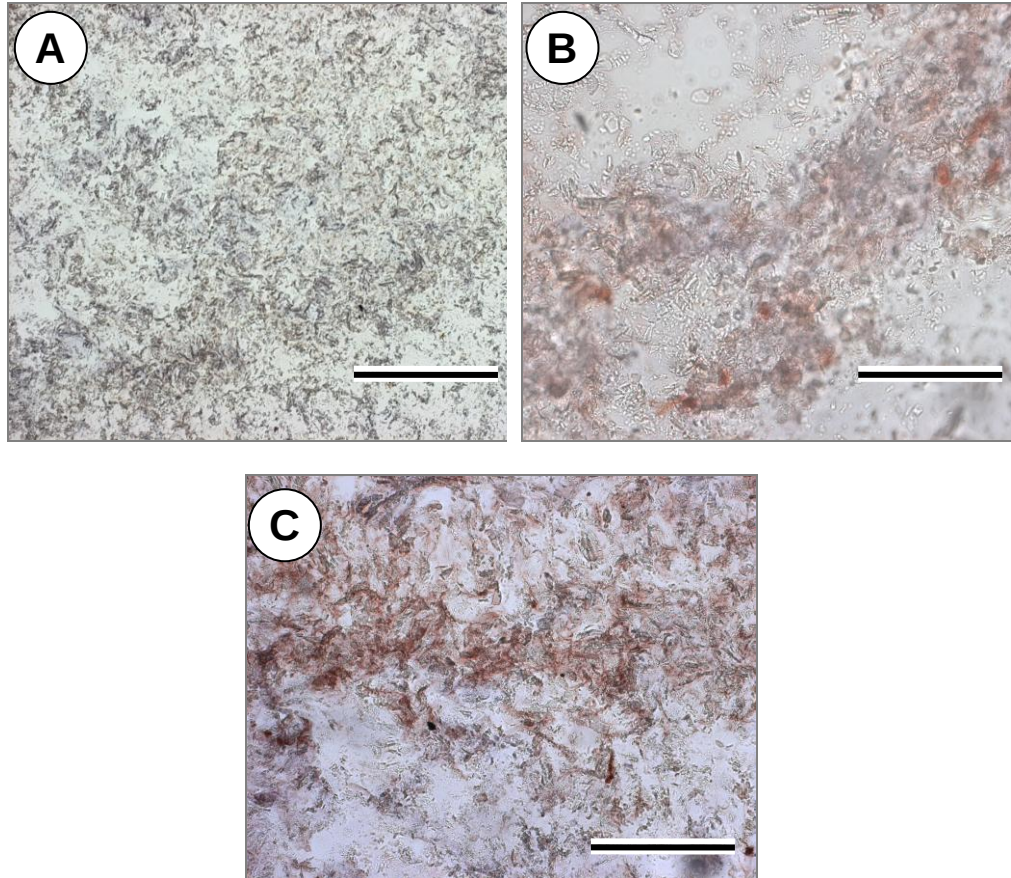
5.2.6 İmmünohistokimya bulguları

İmmünohistokimya, önemli bir kemikleşme işaretçisi olan osteopontin ve osteokalsin için yapıldı. Işık mikroskopuyla alınan fotoğraflar incelendiğinde, MC3T3-E1 ve hOB hücrelerini içeren iskelelerin yüksek oranda Anti-Osteopontin, Anti-Osteokalsin ve Anti-VEGF ile boyandığı gözlemlendi (Şekil 5.19, 5.20 ve 5.21). Anti-VEGF boyamasının aktive edilmiş iskele yüzeylerinde daha yoğun olduğu belirlendi. Yıkama işlemleri sırasında iskelelerin bir kısmı lam yüzeyinden ayrıldığı belirlenmiştir.



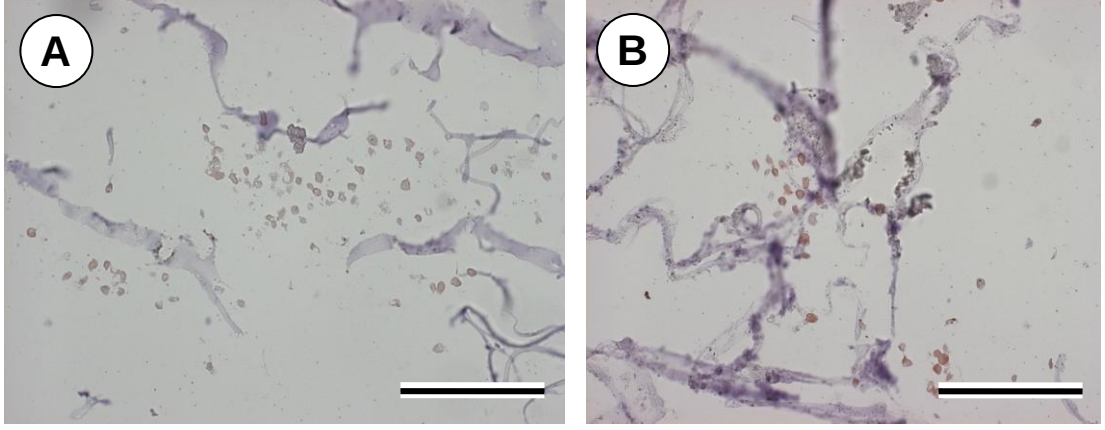
Şekil 5.19 hOB hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin Anti-osteonektin antikorlu boyamaları

A. 7.gün, B. 14. Gün. Boyut çubuğu: 150 µm.



Şekil 5.20 MC3T3-E1 hücreleri tohumlanmış K/HA iskelelerin Anti-osteokalsin antikorlu boyamaları

A. hücre içermeyen kontrol grubu, B. 14. gün, C. 28.gün. Boyut çubuğu: 200 µm

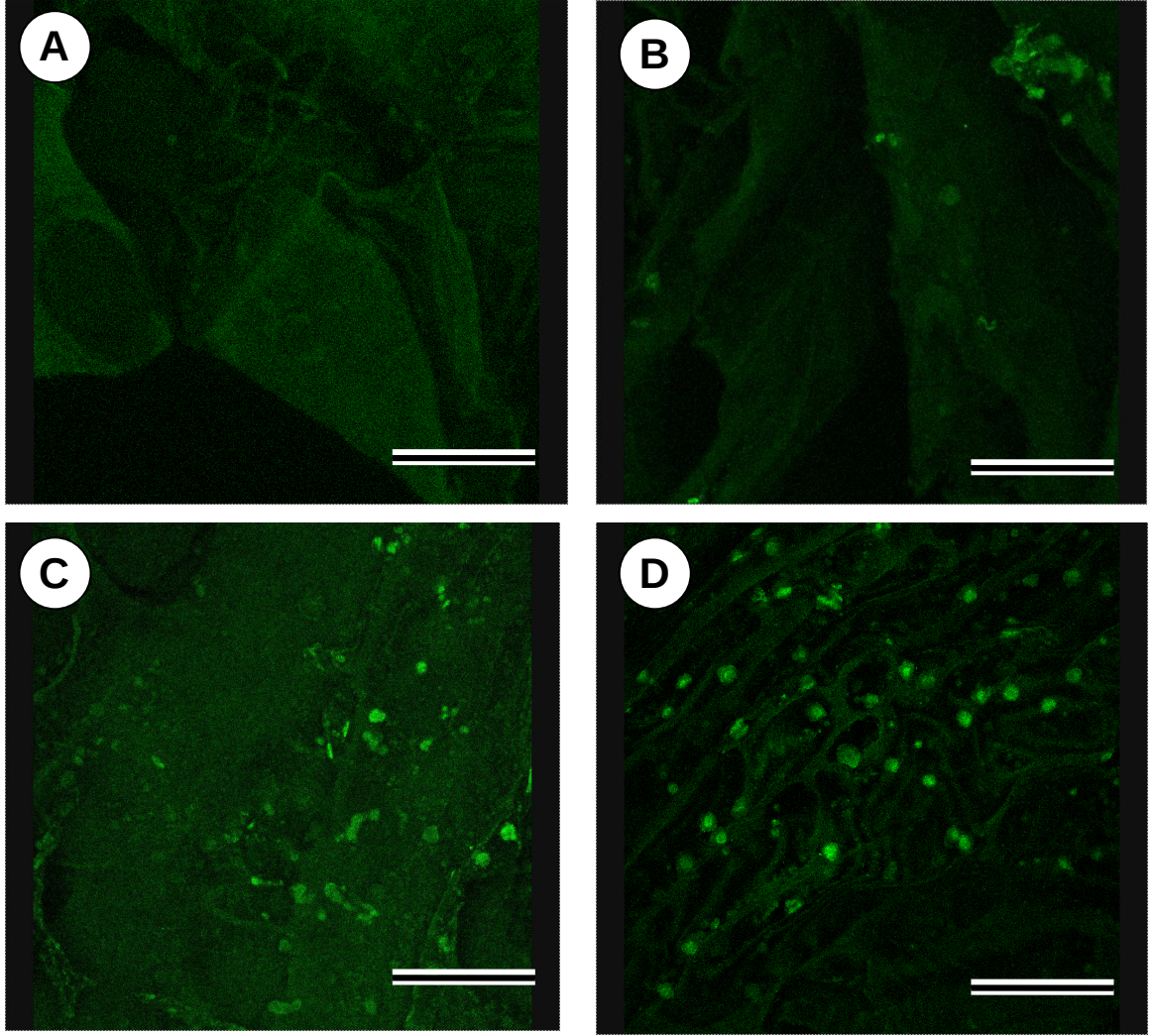


Şekil 5.21 hOB hücreleri tohumlanmış iskelelerin 7. gündeki Anti-VEGF antikoru boyamaları

A. Saf K/HA, B. aktive K/HA iskele. Boyut çubuğu: 150 µm

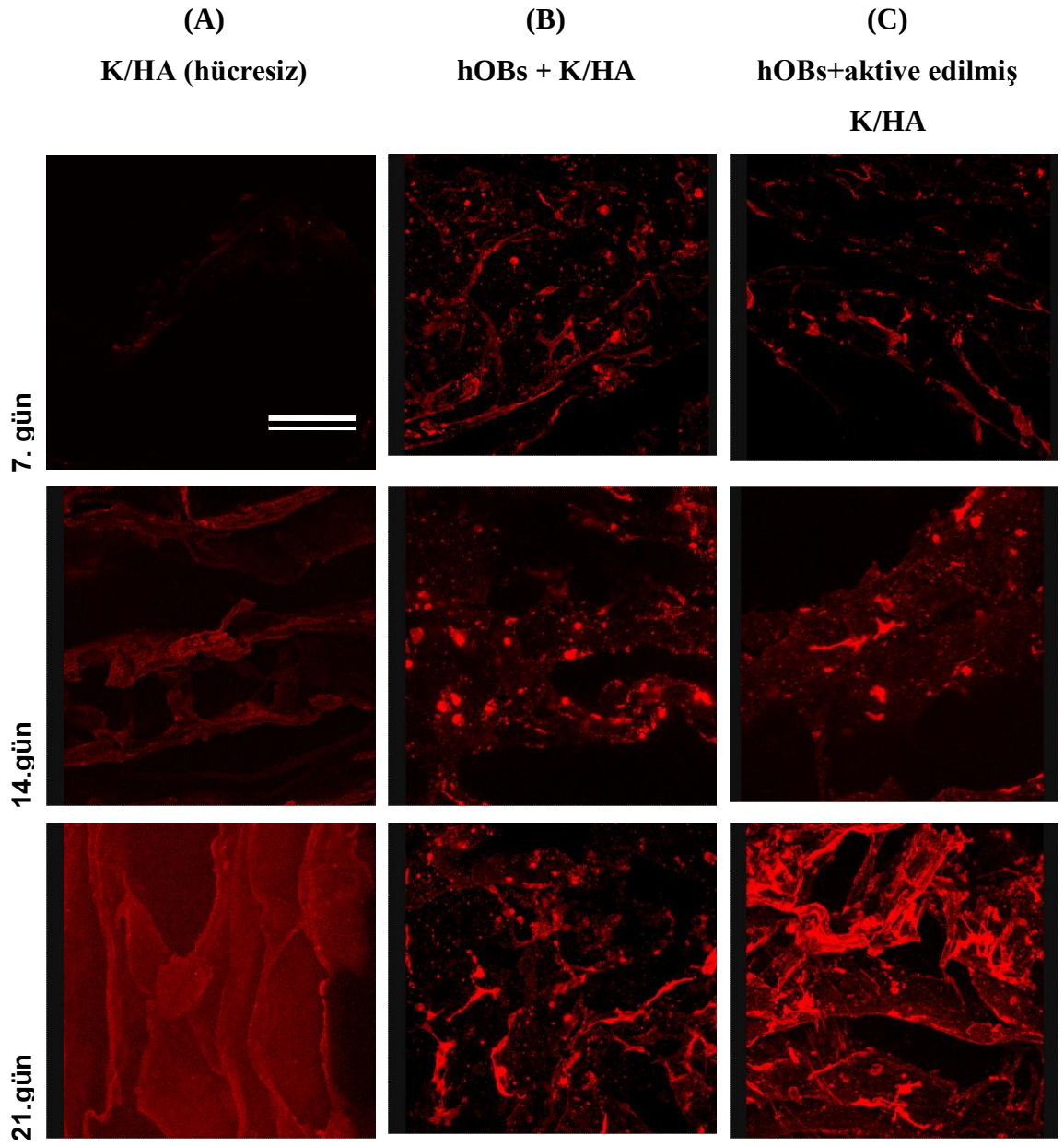
5.2.7 KLM bulguları

DNA ile aktive edilmiş hücre-iskelelerinin belirli oranda GFP eksprese ettikleri ve GFP ekspresyonunun viral dozla orantılı olduğu belirlendi (Şekil 5.22). Bu sonuç transfeksiyon çalışmasının başarılı olduğunu göstermektedir. Şekil 5.23 hOB hücrelerinin iskele içerisindeki homojen dağılımlarını göstermektedir. Fotoğraflardan görüldüğü gibi hücrelerin çoğalması kültür süresinin artışına paralel olarak artmıştır. Aktive edilmiş iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerin çoğalma kapasitelerinin aktive edilmemiş iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerinin çoğalma kapasitelerinden daha iyi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.22 Farklı viral dozlarla aktive edilmiş K/HA iskele yüzeylerine tohumlanmış hücrelerin konfokal lazer mikroskopunda çekilmiş GFP salım görüntüleri

A. 0 MOI, B. 100 MOI, C. 500 MOI, D. 1000 MOI. Boyut çubuğu: 100 μ m



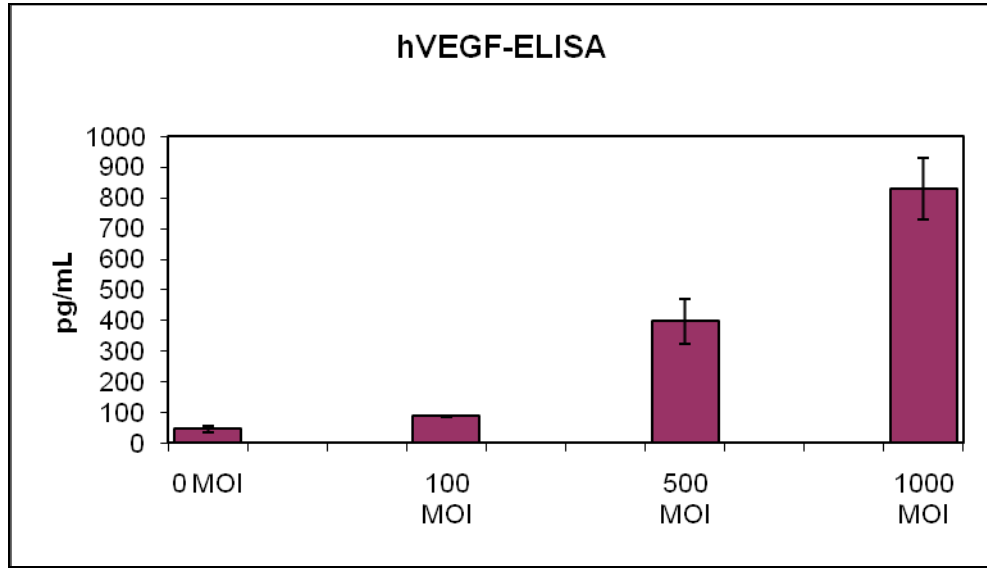
Şekil 5.23 Farklı zaman noktalarında çekilmiş iskele ve hOB-iskele yapılarının konfokal lazer mikroskobu görüntüleri

A. İskele, B. hOB tohumlanmış K/HA iskele, C. Aktive edilmiş K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hOB. Boyut çubuğu: 100 μ m

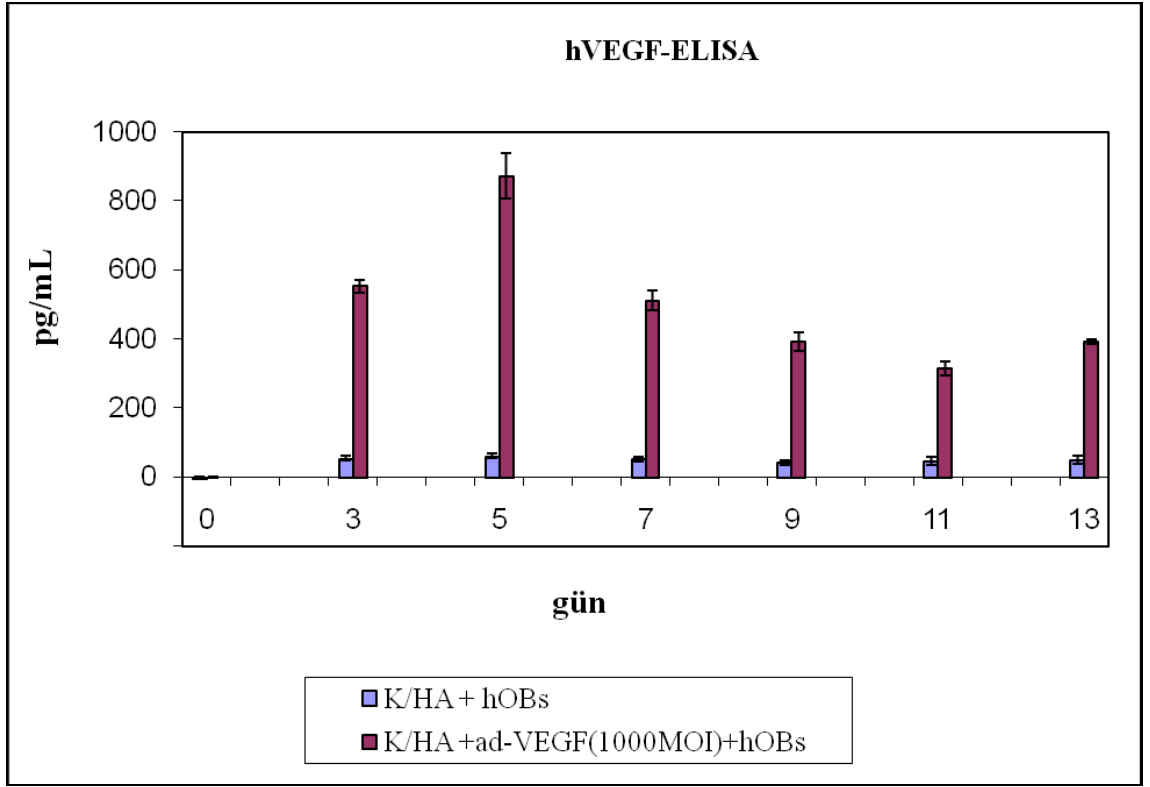
5.2.8 VEGF salım bulguları

İskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerin hVEGF salımını viral dozun artışıyla orantılı bir şekilde artmıştır (0, 100, 500 ve 1000 MOI) (Şekil 5.23). Bu sonuçlar GFP salım bulgularını desteklemektedir (Şekil 5.22).

hVEGF salımını ayrıca 0., 3., 5., 7., 9., 11., ve 13. günlerde sadece 1000 MOI içeren örnekler için yapıldı. K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerin kültür işlemi süresince yüksek oranda hVEGF ürettikleri belirlendi (Şekil 5.25). hVEGF salımının maksimum olduğu noktanın kültürün 5. günü olduğu ve salımın ilerleyen zaman noktalarında giderek azaldığı görülmektedir.



Şekil 5.24 Farklı viral dozlarla aktive edilmiş K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerden ortama 3. günde salınan hVEGF miktarları



Şekil 5.25 1000 MOI ile aktive edilmiş K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerden besiyerine 13 gün boyunca salınan hVEGF miktarları

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, üç-boyutlu biyobozunur kompozit iskeleler ile sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, fare MC3T3-E1 hücre dizisi ve insan osteoblastları (hOB) gibi farklı hücre kaynakları kullanılarak yeni kemik dokusu oluşturulması amaçlanmıştır.

Doku mühendisliği çalışmalarında hücrelerin şekillenmesi, gelişimi ve farklılaşması için iskele seçimi en önemli parametrelerden biridir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan 3-B malzemeler hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi için gerekli olan mikroçevreyi sağlayarak kemik oluşumunu destekleyen ve yönlendiren geçici iskele olarak görev yaparlar. Doku mühendisliği iskeleleri biyouyumlu olmalı, yüksek poröziteye ve geniş yüzey alanına sahip olmalı, hücresel adezyonu ilerletmeli, hücre çoğalmasını arttırmalı ve yeni doku geliştikten sonra vücuttan atılabilmeli, yani biyobozunur olmalıdır.

İskelelerin hazırlanmasında kalıba dökme-partikül uzaklaştırma, dondurarak kurutma, lif bağlama ve gazla köpüklendirme gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır (Mikos *et al.* 1993b ve 1994).

Bu çalışmada PLGA iskelelerin hazırlanmasında partikül uzaklaştırma yöntemi kullanılırken, kitosan/hidroksiapatit iskelelerin hazırlanmasında dondurarak kurutma yöntemi kullanılmıştır.

PLGA'dan çeşitli yöntemlerle hazırlanabilen iskeleler hücre transplantasyonu ve doku mühendisliği çalışmalarında uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Poli(α -hidroksi asit) sınıfında yer alan PLGA'nın kullanımındaki temel problem hidrofobik doğası ve düşük mekanik dayanımıdır. Hidrofobik doğası sebebiyle polimer yüzeyine hücre adezyonu oldukça düşüktür (Vert *et al.* 1994). Cowan ve arkadaşları fare defekt modellerinde saf

PLGA ve mineralize PLGA iskeleler kullandıklarında mineralize PLGA iskelelerin fare defekt modellerinde 4 haftanın sonunda yeni kemik oluşumunu sağlarken, saf PLGA iskelelerin kemik oluşumunu sağlamadığını göstermişlerdir (Cowan *et al.* 2004). Yapılan diğer bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerin seramik içerikli iskele yüzeylerinde *in vivo* ortamda kemik oluşumunu mineralize olmamış iskele yüzeylerine göre yüksek oranda desteklediği de gösterilmiştir (Moutsatsos *et al.* 2001). Bu nedenle PLGA iskeleler mekanik özelliklerini ve hücre bağlama kapasitelerini geliştirmek için SBF içerisinde inkübe edilmiştir. SBF ile inkübasyon işlemi sırasında SBF çözeltisi içerisinde yer alan kalsiyum ve fosfat iyonları iskele yüzeyinde kalsiyum fosfat kristalleri şeklinde çökmektedir. Böylece iskele yüzeyinde kemik benzeri apatit oluşumu ile PLGA'nın kemiğe kimyasal olarak bağlanma yeteneği arttırılmış olmaktadır. SBF ile inkübe edilen iskelelerin analizi SEM, FTIR ve kütle artışı verileri ile incelenmiştir. SEM bulguları PLGA iskele gözeneklerinde çok sayıda mikropartikül oluştuğunu göstermiştir. SBF içerisinde inkübasyonun neticesinde oluşan bu mikropartiküllerin aynı zamanda hücrelerin malzeme yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir (Boyan *et al.* 1986). FTIR analizinde gözlemlenen karbonat ve fosfat bantları, mineralize PLGA iskelelerinde kalsiyum fosfatın varlığını göstermiştir.

PLGA iskelelerin hazırlanmasında NaCl poröjen olarak kullanıldı. Gözenek boyutu iskele içerisine sıvı akışında, hücrelerin tutunmasında, büyümesinde ve farklılaşmasında önemli bir parametredir (Hing 2004, Karageorgiou and Kaplan 2005). İskelelerin optimal gözenek boyutu, matrikse tohumlanmış hücre tipine bağlı olarak 50 μm ile 900 μm arasında değişiklik gösterebilmektedir (Ma 2004). Chang *et al.* (2000) osteoblastların, gözenek boyutu 200-400 μm olan iskele yüzeylerinde yüksek oranda hücresel aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda da boyut dağılımı ~ 150 μm 'den büyük olan gözeneklerin mineralize kemik oluşumunu kolaylaştırdığı belirlenmiştir (Cerroni *et al.* 2002) Bu nedenle, çalışmada 250-300 μm tanecik boyutuna sahip NaCl poröjen olarak kullanıldı. Elde ettiğimiz sonuçlarda 250-300 μm 'lik gözenek boyutunun sıçan mezenkimal hücreleri için de uygun olduğunu gösterdi.

Kemik onarımı ve doku mühendisliği çalışmalarında kalsiyum fosfat içeren malzemelerin yüksek biyouyumluluk özellikleri ve kemik doku oluşumunu destekleme yeteneklerinden dolayı tercih edildikleri uzun yıllardan beri bilinmektedir (Jarcho *et al.* 1977). Ancak bu malzemelerin biyoyıkım süreleri oldukça uzundur ve istenilen şekillerde üretimleri oldukça zordur. Toz halinde ve levha halinde kullanıldıkları zaman, zamanla implantasyon bölgesine tanecikler halinde yayılmaktadır. Bu tip problemleri çözmek için seramiklerin kitosan, kollajen, fibrin, alginat ve poli(α -ester)ler gibi doğal ve sentetik polimerlerle hazırlanmış kompozitlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır (Kokubo *et al.* 1990, Vunjak-Novakovic 1998, Li *et al.* 2001). Kompozit malzemeler, malzemelerin ayrı ayrı kullanımındaki dezavantajları minimuna indirmektedir. Yapılan çalışmalarda kitosanın HA ve β -trikalsiyum fosfatlı kompozitlerinin hücre adezyonunu, göçünü, farklılaşmasını ve çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir (Krebsbach *et al.* 1999 ve Elçin 1998). Bu nedenle çalışmamızda kitosanın hidroksiapatitli kompoziti kullanıldı. Yüksek oranda HA içeriği malzemenin biyoaktivitesini arttırmakta (Wang *et al.* 2007); aynı zamanda artan iskele yüzey alanı hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklemektedir. Ancak, malzemenin HA içeriği % 4'ten yüksek olduğunda iskelenin gözenekliliğinin ve gözenek boyutunun HA partiküllerinin gözenekleri doldurmasından dolayı azaldığı da rapor edilmiştir (Zhang *et al.* 2006). Bu nedenlerle, malzemenin biyoaktivitesi arttırmak, doğal kemik yapısını mümkün olduğunca taklit edebilmek ve darbe dayanımını arttırmak üzere çalışmada kitosan kullanılmış; K/HA iskelerinde K/HA oranı 9/1 (h/h) olarak belirlenmiştir.

Hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında kültür yöntemlerinin rolü büyüktür. Hücrelerin tohumlanmasında ve kültüre edilmesinde çok sayıda statik ve dinamik yöntem kullanılmaktadır (Rucci *et al.* 2002, Weinand *et al.* 2005, Hosseinkhani *et al.* 2006). Biyoreaktörlerde yürütülen dinamik hücre kültürünün, hücrelerin çoğalmasında ve işlevselliklerinin korunmasında pozitif etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Dinamik sistemlerde çoğunlukla sürekli dönme hareketi söz konusudur. Bu tip sistemler hücrelere ihtiyaç duydukları besinin ve oksijenin sağlanmasında; metabolik aktiviteler neticesinde oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılmasında oldukça etkindirler. Statik sistemlerde sürekli bir hareketlilik söz konusu olmayıp, bu nedenle besinlerin ve

oksijenin yapı iskelesi içerisine difüzyonu oldukça yavaş ve düzensizdir. Yüzeye bağımlı hücrelerin homojen bir şekilde iskele yüzeyine tutunması *in vitro* doku oluşumu için oldukça önemlidir (Freed and Vunjak-Novakovic 1998). Dinamik sistemler 3-B iskelelere hücrelerin yüksek yoğunlukta ve homojen bir şekilde yayılmasını sağlar (Freed and Vunjak-Novakovic 2000, Altman *et al.* 2002, Mauck *et al.* 2002, Martin *et al.* 2004, Holtorf *et al.* 2005). Statik ortamda yapılan hücre tohumlama yöntemlerinde hücrelerin büyük çoğunluğu iskele yüzeyine tutunmakta ve iç kısımlara ilerleyememektedir. Yani statik kültür yöntemleri hücreler için ideal bir ortam sağlayamamaktadır (Ishaug *et al.* 1998). Yapılan çalışmalar biyoreaktörde kültürü yapılan osteoblast benzeri hücre dizilerinin, MC3T3-E1 fare osteoblastlarının ve sıçan kemik iliği kök hücrelerinin büyüme, farklılaşma yeteneklerinin ve mineralize matriks üretimlerinin statik ortamda kültüre edilen hücrelere kıyasla büyük ölçüde arttığını göstermiştir (Freed and Vunjak-Novakovic 2000, Altman *et al.* 2002, Mauck *et al.* 2002). Bu tez çalışmasında elde edilen SEM, MTT ve immünohistokimya bulguları incelendiğinde benzer sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir.

MTT testi hücrelerin canlılık ve çoğalma yetenekleri hakkında bilgi veren kolorimetrik bir yöntem olup, metabolik aktivitesini koruyan sağlıklı hücreler tarafından sarı renkli MTT'nin indirgenerek lacivert-mor renkli formazan kristalleri oluşturması esasına dayanır. Bu test iskelelerin gözenekli yapıları ve hücrelerin gözenekli yapı içerisinde dağılım seviyeleri hakkında bilgi vermektedir. Mineralize PLGA iskelelere tohumlanıp dinamik sistemde kültüre edilen hücrelerin çoğalma kapasitelerinin statik sistemde kültürü sürdürülenlerinkinden daha yüksek olduğu, yapılan çalışmalar neticesinde belirlendi. Işık mikroskobu incelemelerinden elde edilen görüntüler, iskele yüzeyinde formazan kristallerinin homojen olarak dağıldığını göstermektedir (Şekil 5.5). Bu sonuç, hücrelerin iskele yapının içerisine homojen bir şekilde dağıldığının göstergesidir. Hücrelerin iskele yapının içerisinde homojen olarak dağılması aynı zamanda biyoreaktörde yapılan tohumlamanın etkinliğinin yüksek olduğunu da göstermektedir.

Biyomalzemenin osteojenik kapasitesini belirlemek için en güvenilir yöntemlerden birisi, malzeme yüzeyinde oluşan mineralizasyonu belirlemektir. Mineral oluşumunu

belirlemek için genellikle Alizarin kırmızısı boyası S ve von Kossa boyaması gibi yöntemler kullanılmaktadır (Matlaga *et al.* 1976, Goto *et al.* 2003). Bu tip boyalar mineral kristallerine spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bu çalışmada AR-S ve von Kossa boyamaları hücre-iskele (1. ve 2. grup) yapılarında inkübasyon süresiyle orantılı bir şekilde artan mineralizasyonun gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 5.9 ve 5.16).

Bazı hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler osteojenik farklılaşmada ve kemik mineralizasyonunda rol oynamaktadırlar. Doku mühendisliğinde temel problemlerin başında yeni oluşan dokuya yeterli besinin ve oksijenin sağlanması ve metabolik aktiviteler neticesinde oluşan atıkların uzaklaştırılması gelmektedir. Yeni oluşan dokunun fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gerekli olan bu ihtiyaçlar, ilgili bölgede yeni oluşan vasküler ağlar tarafından sağlanabilmektedir. Ancak, implante edilen malzemenin yeterli kabul edilebilecek düzeydeki neovaskülarizasyonu genellikle iki-üç haftalık bir süre içerisinde gerçekleşebilmektedir. Bu süreyi minimuma indirmek amacıyla vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyojenik büyüme faktörleri kullanılmaktadır (Glowacki 1998). Büyüme faktörlerinin ilgili bölgeye nakli sırasında kullanılan en basit yöntem doğrudan enjeksiyondur. Bu yöntemin etkinlik süresi büyüme faktörünün hızlı diffüzyonu ve biyolojik aktivitesini hızla kaybetmesi sebebiyle oldukça kısadır (Han *et al.* 2000). Son yıllarda doku mühendisliği çalışmalarında büyüme faktörlerinin etkinliğini artırmak için gen tedavisi yöntemleri de kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde DNA, hücre içerisine viral ya da viral olmayan vektör sistemleri aracılığıyla aktarılmaktadır. Transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olması sebebiyle son dönemde yapılan çalışmalarda adenovirüs ve retrovirüs gibi çeşitli viral vektörlerin kullanımı tercih edilmektedir (Vorbürger and Hunt *et al.* 2002). Bu tez çalışmasında hOB hücrelerinin transfeksiyonu için VEGF ve GFP sentezleyen adenoviral vektör kullanılmıştır. Öncelikle uygun viral dozun hVEGF salımına etkisini belirlemek amacıyla, 100 MOI, 500 MOI ve 1000 MOI olmak üzere 3 farklı viral doz kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar en etkin viral dozun 1000 MOI olduğunu göstermiştir (Şekil 5.23). Bu viral dozun hVEGF salım etkinliği ve süresi 0., 3., 5., 7., 9., 11., ve 13. günler için takip edildi. En yüksek hVEGF salımının 5. günde olduğu ve salımın ilerleyen günlerinde azaldığı belirlendi. Transfeksiyonun etkinliğini kalitatif olarak belirlemek için konfokal lazer mikroskopisi (KLM) kullanıldı. Elde edilen KLM

görüntüleri incelendiğinde, en yüksek GFP salımının 1000 MOI içeren hücre-iskele yapısında olduğu belirlendi (Şekil 5.21). Bu sonuçlar hVEGF salım sonuçları ile uyum içerisindedir. KLM, aynı zamanda hOB hücrelerinin iskele yüzeyinde tutunma ve çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi için yapıldı. Elde edilen bulgular, aktive edilmiş iskele yüzeyine tohumlanmış hücrelerin çoğalma kapasitelerinin diğer gruba göre yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 5.22). Bu sonuç, hVEGF salımının hücreler için önemini kanıtlamaktadır.

Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin askorbik asit, β -gliserofosfat ve dekzametazon içeren vasat ortamında kültüre edildikleri zaman osteoblastlara farklılaşma eğiliminde oldukları bilinmektedir (Bellows and Aubin 1989). Askorbik asit, osteoblastik markörlerin salımı ve osteoblast benzeri hücre dizilerinin, fetal sıçan kalvaria hücrelerinin mineralizasyonu için gereklidir (Aronow *et al.* 1990). β -gliserofosfat, inorganik fosfat kaynağıdır ve mineralizasyon için gereklidir. Dekzametazon, kemik oluşumunda oldukça önemli bir role sahiptir. Dekzametazonun askorbik asitli ve β -gliserofosfatlı kombinasyonları hücrelerin osteojenik farklılaşmasını tetiklemektedir. Bu tip tetikleyiciler özellikle 14 günlük kültür işleminin ardından daha etkin bir şekilde gözlemlenebilmektedir (Cooper *et al.* 1999, Qui *et al.* 2001). Bu çalışmada, kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve MC3T3-E1 hücrelerinin, askorbik asit, β -gliserofosfat ve dekzametazon içeren vasat ortamında kültürleri yürütüldü. Elde edilen sonuçlar, her iki tip hücrenin de kültür işlemlerinin sonunda osteoblastlara dönüştüğünü göstermiştir (Şekil 5.6 ve Şekil 5.19).

Kemik oluşum prosesinde biyomarkör olarak kullanılan alkalın fosfataz (ALP), kemik sialoproteini II, osteonektin ve kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2) öncü olarak sentezlenirken, osteopontin ve osteokalsin sonraki evrelerde sentezlenmektedir (Zhu *et al.* 2001, Jaiswal *et al.* 2003, Young 2003). ALP kemik metabolizmasıyla ve osteoblastların farklılaşmasıyla bağlantılı olan kemik matriks enzimidir. Bu nedenle ALP aktivitesi, osteoblast farklılaşması ve osteojenik özelliklerinin belirlenmesinde en sık incelenen parametredir (Ohbayashi *et al.* 1999). Osteonektin, kemik oluşumu sırasında osteoblastlar tarafından sentezlenen bir glikoproteindir. Kalsiyum ve kollajene

bağlanma yeteneğine sahiptir. Osteopontin, aspartik asit ve glutamik asit gibi asidik amino asitler bakımından zengin olan kemiğin organik bileşenidir. Kemik gelişiminin ilk dönemlerinde osteoblastlar tarafından sentezlenir. HA'e bağlanma yeteneğine sahiptir. Osteokalsin, kemik dokusunda mineralizasyon ve kalsiyum iyon dengesini sağlamada görevli olan küçük bir proteindir. İnsan vücudunda en fazla oranda bulunan 7. protein, kemik dokusunda kollajenden sonra en fazla bulunan 2. proteindir. Kemiğin temel iki bileşeni olan kollajen ve hidroksiapatite bağlanabilmektedir. Serumda yüksek oranda bulunan osteokalsin kemik mineral yoğunluğunun artışına işaretler. Yapılan bu tez çalışmasında, kemik oluşumunu kanıtlamak için ALP, osteopontin ve osteokalsin biyomarkörleri kullanılmıştır. Tüm deney grupları için osteopontin ve/veya osteokalsin antikor boyamaları yapılırken, ALP boyaması sadece 3. ve 4. gruplar için yapılmıştır. Çalışmamızın sonuçları ALP aktivitesi ve osteopontin aktivitesinin 14. günde, osteokalsin aktivitesinin ise 21. günde en yüksek seviyesine ulaştığını göstermiştir. Elde edilen bu bulgular, Schecroun ve arkadaşlarının bulgularıyla uyum içerisindedir (Schecroun and Delloye 2003). Dinamik ortam koşullarında kültüre edilen kemik iliği mezenkimal kök hücreleri içeren mineralize PLGA iskelelerin statik ortam koşullarında kültüre edilen iskelelere oranla daha yüksek oranda anti-osteopontin ile boyandığı gözlemlendi.

Bu sonuçlar;

- 1) Mineralize PLGA iskele yüzeyine tohumlanmış sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik vasat ortamında biyoreaktörde kültürleri sürdürüldüğünde osteoblastlara farklılaştığını,
- 2) Fare MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik vasat ortamında K/HA iskele yüzeyine tutunup çoğaldığını ve kemik benzeri dokuyu oluşturduğunu,
- 3) Ad-GFP-VEGF ile aktive edilen K/HA iskele yüzeyine tohumlanmış insan osteoblastlarının kemik benzeri dokuyu oluşturduklarını göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, M., McCarthy, M.B., Gronowicz, G. 1999. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials*, 20:211–20.
- Altman, G.H., Horan, R.L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P.R. and Volloch, V. 2002. Cell differentiation by mechanical stress, *FASEB J*, 16, 270–272.
- Aronow, M.A., Gerstenfeld, L.C., Owen, T.A., Tassinari, M.S., Stein, G.S. and Lian, J.B. 1990. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 143, 213-221.
- Athanasίου, K.A., Niederauer, G.G. and Agrawal, C.M. 1996. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17, 93-102.
- Babensee, J., McIntire, L.V. and Mikos, A.G. 2000. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharmaceutical Research*, 17, 497-504.
- Bayraktar, D. and Taş, A.C. 2000. Preparation of biomimetic HA precursors at 37°C in urea- and enzyme urease-containing synthetic body fluids. *Bioceramics: Materials and Applications III*, Ceramic Transactions, 110, 39-41,44
- Bellows, C.G., and Aubin, J.E. 1989. Determination of the numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Dev Biol.*, 133, 8.
- Bolender, M.E. 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 165-170.
- Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D. and Schwartz, Z. 1986. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*; 17, 137-46.
- Calanis, E., Pash, J. and Varghese, S. 1993. Skeletal growth factors. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*, 3, 155-166.
- Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S., Youn, H.J., Ryu, H.S., Chung, S.S. and Park, K.W. 2000. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterial*, 21, 1291-1298.

- Cerroni, L., Filocamo, R., Fabbri, M., Piconi, C., Caropreso, S. and Condo, S.G. 2002. Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an *in vitro* study. *Biomolecular Engineering*, 19, 119-124.
- Cho, S. B., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Azumi, R. and Matsumoto, M. 1996. Bio-solid-chemical process of apatite formation on LB monolayer in Simulated Body Fluid. Elsevier Science Ltd., 404, 405, Pergamon.
- Cooper, M.S., Hewison, M. and Stewart, P.M. 1999. Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol.*, 163, 159.
- Copenhaver, W.M., Kelly, D.E. and Wood, R.L. 1978. *Bailey's Textbook of Histology*, ed. 17. Baltimore: Williams and Wilkins, pp 170-205.
- Cowan, C.M., Shi, Y.Y., Atami, O.O., Chau, Y.F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C.H., Wu, B. and Longaker, M.T. 2004. Adipose-derived adult stromal cells heal critical size Mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*, 22: 960.
- Cutright, D. E. and Hunsuck, E.E. 1971. Fracture reduction using a biodegradable material. *J. Oral. Surg.*, 29, 393-397.
- David, L., Argenta, L. and Fisher D. 2005. Hydroxyapatite cement in pediatric craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg*, 16, 129–33.
- Dandurand J, Delpech V, Lebugle A, Lamore A, Lacabanne C. 1990. Study of the mineral-organic linkage in an apatitic reinforced bone cement. *J Biomed Mater Res.*, 24, 1377-1384.
- Davies, J.E. 1996. *Interactions of Bone Cells with Ceramics*. Elsevier Science Ltd., 27-29, Pergamon.
- Dubok, V.A. 2000. Bioceramics-Yesterday, Today, Tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 39, 381-392.
- Duckeyne, P. and Qiu, Q. 1999. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell. *Biomaterials*, 20, 2287-2303.
- Ehara, A., Ogata, K., Imazato, S., Ebisu, S., Nakano, T. and Umakoshi, Y. 2003. Effects of α -TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. *Biomaterials*, 24, 831–6.

- Elçin, A.E., Elçin, Y.M. and Pappas, G.D. 1998. Neural tissue engineering: adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffolds. *Neurol Res.*, 20, 648-654.
- Elçin, Y.M. 2003. Tissue engineering, stem cells and gene therapies, Kluwer-Plenum Press, AEMB, 534: 350 sayfa, London, NY, Moscow.
- Elçin, Y.M. 2004. Tissue engineering and stem cells, In: Biomaterials, from molecules to engineered tissues, Kluwer-Plenum Press, AEMB, 553, 301-316, London, NY, Moscow.
- Glowacki J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop.*, 355, S82-89.
- Goldstein, A. S., Zhu, G., Morris, G. E., Meszlenyi, R. K. and Mikos, A. G. 1999. Effect of Osteoblastic Culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds. *Tissue Engineering*, 5, 421-433.
- Goldstein, A.S., Juarez,T.M., Helmke, C.D., Gustin, M.C. and Mikos, A.G. 2001. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22, 1279-1288.
- Goto, T., Kajiwar, H., Yoshinari, M., Fukuhara, E., Kobayasi, S. and Tanaka, T. 2003. In vitro assay of mineralized tissue formation on titanium using fluorescent staining with calcein blue. *Biomaterials*, 24, 3885-3892.
- Gümüşderelioğlu, M., ve Türkoğlu, H. Mayıs 2000. Doku Mühendisliği. Bilim ve Teknik.
- Ferrara N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.*, 25, 581-611.
- Freed, L. E., Marquis, J.C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A.G. and Langer, R. 1993. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 11-23.
- Freed, L.E. and Vunjak-Novakovic, G. 1998. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Delivery Rev.*, 33, 15-30
- Freed, L.E. and Vunjak-Novakovic, G. 2000. Tissue engineering bioreactors. In: R.P. Lanza, R. Langer and J. Vacanti, Editors, *Principles of tissue engineering* (2nd ed), Academic Press, San Diego , pp. 143–156.

- Han, S., Mahato, R.I., Sung, Y.K. and Kim, S.W. 2000. Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther.*, 2, 302–317.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hing, K.A. 2004. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.*, 362, 2821-2850.
- Holtorf, H.L., Jansen, J.A. and Mikos, A.G. 2005. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone, *J Biomed Mater Re.*, 72, 326–334.
- Hosseinkhani, H., Yamamoto, M., Inatsugu, Y., Hiraoka, S.I., Shimokawa, H. and Tabata, Y. 2006. Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture. *Biomaterials*, 27, 1387-1398.
- Hull C. 1990. Method for production of three-dimensional objects by stereolithography. US Patent 4929402
- Ishaug, S. L., Yaszemski, Bizios, M. J. R. and Mikos, A. G. 1994. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 1445–1453.
- Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G. 1998. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblast in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 19, 1405-1412.
- Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G. 1997. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36, 17-28.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. and Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.*, 64, 29.
- Jarcho, M., Kay, J.F., Gumaer, K.I., Doremus, R.H. and Drobeck, H.P. 1977. Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng.*, 1, 79-92.
- Junquera, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R. 1993. *Temel Histoloji*. 170-196.
- Karageorgiou, V. and Kaplan, D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5473-5491.

- Kim I.S., Park J.W., Kwon I.C., Baik, B.S. and Cho, B.C. 2002. Role of BMP, β - actin , and chitosan in early bony consolidation in distraction osteogenesis in a dog model. *Plast Reconstr Surg.*, 109, 1966–77.]
- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. and Yamamuro, T. 1990. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res.*, 24, 721-734.
- Krebsbach, P.H., Kuznetsov, S.A., Bianco, P. and Robey, P.G. 1999. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 10, 165-81.
- Langer, R. 1993b. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 14, 323-330.
- Langer, R., Vacanti, T. and Tateishi, T. 2000. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51, 273-279.
- Lee, Y.M., Park, Y.J., Lee, S.J., Ku, Y., Han, S.B., Choi, S.M., Klokkevold, P.R. and Chung, C.P. 2000. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol.*, 71, 410–417.
- Lee, J.Y., Nam, S.H., Park, Y.J., Lee, Y.M., Seol, Y.J., Chung, C.P. and Lee, S.J. 2002. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release*, 78, 187–197.
- Li, Y., Ma, T., Kniss, D.A., Lasky, L.C. and Yang, S.T. 2001. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnol Prog.*, 17, 935-944.
- Lisignoli, G., Zino, N., Remiddi, G., Piacentini, A., Puggioli, A., Trimarchi, C., Fini, M., Maraldi, N.M. and Facchini, A. 2001. Basic fibroblast growth factor enhances in vitro mineralization of rat bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid based polymer scaffold. *Biomaterials*, 22, 2095–105.
- Liu, G. J., Takadama, H., Miyaji, F., Kokubo, T. and Nakamura, T. 1996. Apatite coated on organic polymer by biomimetic process: Improvement in adhesion to substrate by ultraviolet irradiation. Elsevier Science Ltd, 407, Pergamon.
- Ma PX. 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today*, 7, 30-40.

- Martin, I., Padera, R.F., Vunjak-Novakovic, G. and Freed, L.E. 1998. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthopaed Res.*, 16, 181-189.
- Martin, I., Wendt, D. and Heberer, M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering, *Trends Biotechnol.*, 22, 80–86.
- Matlaga, B.F., Yasceuchak, L.P. and Salthouse, T.N. 1976. Tissue response to implanted polymers:the significance of sample shape. *J Biomed Mater Res.*,4, 1.
- Mauck, R.L., Seyhan, S.L., Ateshian G.A. and Hung, C.T. 2002. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels, *Ann Biomed Eng.*, 30, 1046–1056.
- Midy, V. and Plouet, J. 1994. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.*, 199, 380-386.
- Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., Vacanti, J.P. and Langer, R. 1993. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 14, 323-330.
- Mikos, A.G., Bao, Y., Cima, L.G., Ingber, D.E., Vacanti, J.P., and Langer, R. 1993b. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27,183-189.
- Mikos, A.G., Thorsen, A.J., Czerwonka, L.A., Langer, R., Winslow, D.N. and Vacanti, J.P. 1994. Preparation and charcterization of poly(l-lactic acid)foams. *Polymer*, 35, 1068-1077.
- Mikos, A.G., Thorsen, A.J., Czerwonka, L.A., Bao, Y., Langer, R., Winslow, D.N. and Vacanti, J.P. 1994. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer*, 35, 1068-1077.
- Mikos, A. 2000. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 114-119.
- Moutsatsos, I.K., Turgeman, G., Zhou, S., Kurkalli, B.G., Pelled, G., Tzur, L., Kelley, P., Stumm, N., Mi, S., Muller, R., Zilberman, Y., and Gazit, D. 2001.

- Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther.*, 3 (4), 449-61.
- NIH Technical Guide, 1995. NIH guide for the care and use of laboratory animals. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.
- Ohbayashi, E., Matsushima, K., Hosoya, S., Aabeyk, Y. and Yamazaki, M. 1999. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endodon.*, 25, 30-33.
- Ohgushi, H., Okumura, M., Tamai, S., Shors, E.C. and Caplan, A.I. 1990. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res.*, 24, 1563–1570.
- Park, Y.J., Lee, Y.M., Park, S.N., Sheen, S.Y., Chung, C.P., Lee, S.J. 2000. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21, 153–159.
- Praemer, A., Furner, S. and Rice, P. 1992. Musculoskeletal conditions in the United States. Park Ridge: Am. Acad. Orthop. Surg. P. 1-85.
- Roller S. 2003. Chitosan: New food preservative or laboratory curiosity. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press.
- Rucci, N.I, Migliaccio, S., Zani, B.M., Taranta, A. and Teti, A. 2002. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved Rotating Wall Vessel bioreactor (RWV). *J Cell Biochem.*, 85, 167-179.
- Qiu, Q., Ducheyne, P., Gao, H. and Ayyaswamy, P. 1998. Formation and differentiation of three-dimensional rat marrow stromal cell culture on microcarriers in a rotating-wall vessel. *Tissue Eng.*, 4(1), 19-34.
- Qiu, Q., Duckeyne, P. and Ayyaswamy, P. 2001. 3D-bone tissue engineered with bioactive microsphere in simulated microgravity. *In Vitro Cell Dev. Biol. Animal.*, 37, 157-165.
- Sachlos, E. and Czernuszka, J.T. 2003. Making tissue engineering scaffolds work. review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater.*, 5, 29-39.
- Schecroun, N. and Delloye, Ch. 2003. Bone-like nodules by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone*, 32, 252-260.

- Schwarz, R.P., Goodwin, T.J. and Wolf, D.A. 1992. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. *J Tissue Cult Method*, 14, 51-58.
- Shikinami, Y. and Okuno, M. 1999. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials*, 20, 859–877.
- Shikinami, Y., Hata, K. and Okuno, M. 2000. Hydroxylapatite particle/polylactide composites. *Bioceramics*, 9, 391-394.
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Jr, Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J.L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H.P., Carano, R.A. and Filvaroff, E.H. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 9656-9661.
- Sun, J.S., Tsuang, Y.H., Liao, C.J., Liu, H.C., Hang, Y.S. and Lin, F.H. 1997. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J Biomed Mater Res.*, 37, 324–334.
- Şenel, F. Nisan, 2004. *Bilim ve Teknik. Yeni Ufuklara. Yapay Organlar.*
- Tanahashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T. and Yamamuro, T. 1994. Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process. *J. American Ceramic Society.*, 77, 2805-2808.
- Tanahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y. 2005. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 26, 3587–3596.
- Terbojevich, M. and Muzarelli, R.A. *Chitosan*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press., 2000.
- Thomson, R.C., Wake, M.C., Yaszemski, M. J. and Mikos, A.G. 1995. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Advances in Polymer Science*, 122, 245-274.
- Vander, A.J., Sherman, J.H. and Luciano, D.S. 1985. *Human Physiology*. McGraw-Hill, New York. pp. 341, 366.
- Vert, M., Mauduit, J. and Li, S. 1994. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials*, 15, 1209-1213.

- Vorburger, S.A. and Hunt, K.K. 2002. Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist*, 7, 46-59.
- Vunjak-Novakovic, G. 1998. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog.*, 14, 193-202.
- Wang, H., Li, Y., Zuo, Y., Li, J., Ma, S. and Cheng, L. 2007. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28,3338-3348.
- Weinand, C., Pomerantseva, I., Neville, C.M., Gupta, R., Weinberg, E. and Madish, I. 2005. Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone*, 38, 555-563.
- Yannas, I. V. and Burke, J. F. 1980. Desing of an artificial skin. Basic desing principles. *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, 65.
- Yasunago, T., Matsusue, Y., Furukavva, T., Shikinami, Y., Okuno, M. and Nakamura, T. 1999. Bonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxyapatite particles. *J Biomed Mater Res.*, 47, 412-419.
- Yeong, K. C. B., Wang, J. and Ng, S. C. 2000. Synthesis of hydroxyapatite via mechanical activation. *bioceramics: materials and applications III*, Ceramic Transactions, 110, 17-20.
- Yokogawa, Y., Paz Reyes, J., Mucalo, M., Toriyama, M., Kawamoto, K., Suzuki, T., Nishizawa, K., Nagata, F. and Kamayama, T. 1997. Growth of Calcium Phosphate on Phosphorylated Chitin Fibres. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 8, 407-412.
- Zhang, R. and Ma, P.1999. Poly (α -hydroxyl acids) / hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 446-455.
- Zhang, Y. and Zhang, M.Q. 2004. Cell growth and function on calciumphosphate reinforced chitosan scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.*,15, 255–260.
- Zhang, Y.F., Cheng, X.R., Chen, Y., Shi, B., Chen, X.H., Xu, D.X. and Ke, J. 2006. Three dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. *J. of Biomat Application*, 0, 1-17.

- Zelzer, E., McLean, W., Fukai, N., Reginato, A.M., Lovejoy, S., D'Amore, P.A. and Olsen, B.R. 2002. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*, 129,1893-1904.
- Zhu, J.X., Sasano, Y., Takahashi, I., Mizoguchi, I. and Kagayama, M. 2001. Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J.*, 33, 25-35.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aysel KOÇ

Doğum Yeri : Malatya

Doğum Tarihi : 03.01.1978

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Malatya Lisesi, Malatya

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, Haziran 2000.

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya (Biyokimya) Anabilim Dalı, Ankara, Temmuz 2003.

Çalıştığı Kurum

Ankara Üniversitesi Kimya (Biyokimya) Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi
(Ekim 2002'den beri)

SCI KAPSAMINDAKİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA MAKALELERİ

- (1) Koç A, Durkut S, Elçin AE, Tan E, Elçin YM. "Evaluation of Modified CMC and CMC-PVA as Miscible Polymer Blend Membranes for Hepatocytes". MACROMOLECULAR BIOSCIENCE (Macromol Biosci), 7: 681-689 (2007).
- (2) İnanç B, Elçin AE, Koç A, Baloş K, Parlar A, Elçin YM. "Encapsulation and Osteoinduction of Human Periodontal Ligament Fibroblasts in Chitosan-Hydroxyapatite Microspheres". JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, PART A (J Biomed Mater Res A), 82(4): 917-926 (2007).
- (3) Emin N, Koç A, Durkut S, Elçin AE, Elçin YM. "Engineering of Rat Articular Cartilage on Porous Sponges: Effects of TGF- β 1 and Microgravity Bioreactor Culture". ARTIFICIAL CELLS, BLOOD SUBSTITUTES AND BIOTECHNOLOGY (Artif Cell Blood Sub), 36 (21.11.2007'de yayına kabul).

- (4) **Koç A**, Emin N, Elçin AE, Elçin YM. “*In Vitro* Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells in a Microgravity Bioreactor”. JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS (J Bioact Comp Pol), (baskıda, Mayıs 2008).