

# Kıkırdak Onanımında Doku Mühendisliği Uygulamaları

Alpaslan Şenköylü\*, Feza Korkusuz\*\*

## Giriş

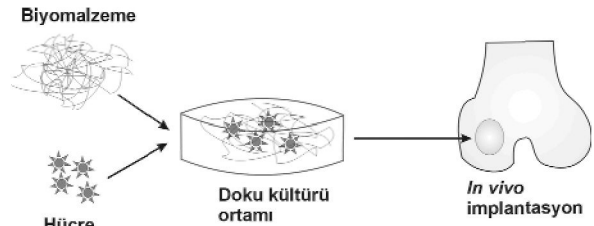
Bilim insanları uzun süredir, sinovyal eklemlerde onarım ve rejenerasyon yeteneği sınırlı olan kıkırdak kaybı veya dejenerasyonunun tedavisinde yeni yaklaşımlar üzerinde çalışmaktadır. Burada onarım ve rejenerasyon kavramları arasındaki farkı açıklamak gerekmektedir. Onarım, yaralanan eklem kıkırdağının hiyalin kıkırdağa benzeyen ancak yapı, işlev ve içerik olarak farklı olan yeni bir doku ile yenilenmesidir. Rejenerasyon ise, normal eklem kıkırdağından ayırt edilemeyen yeni doku oluşumunu ifade eder. Diğer bir deyişle doku kendisi olarak yenilenir. Doku mühendisliği, biyolojik dokuların sentetik ya da sentetik olmayan malzemeler üzerine yerleştirilen hücreler veya bunlara eklenen sistemik ya da yerel düzenleyicilerle onarımıdır (Şekil 1). Son yıllarda yapay ağlar ve hücrelerin doku mühendisliğinde kullanılmasının yanı sıra, büyümeyi ve farklılaşmayı tetikleyen veya önleyen sistemik veya yerel etkili düzenleyicilerin doku mühendisliğinde kullanılması söz konusu olup; özellikle genetik taşıyıcılar kullanılarak bu mediatörlerin hasarlı dokuya aktarılmasına yönelik çok sayıda disiplinler arası çalışma gerçekleştirilmiştir<sup>(1)</sup>.

Modern anlamda tarihsel gelişimine bakılacak olursa, 20. yüzyılın başlarında Lexer taze kadavradan aldığı allogreftleri eklem rekonstrüksiyonunda kullanarak "doku mühendisliği" kavramını ilk dile getiren araştırmacı olmuştur<sup>(2)</sup>. Önceleri; kıkırdak, kemik, diş ya da başka dokuların yapay malzemelerle onarılması çabası başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Sonraki yıllarda genel anlamda malzeme teknolojisindeki gelişmelerle birlikte tıpta yeni metal veya metal olmayan seramik ve polimer gibi sentetik malzemelerin geliştirilmiş olması doku mühendisliği uygulamalarına hız vermiştir.

Doku mühendisliği ile elde edilen dokular, in vivo ortamda doğal dokular gibi fiziksel, kimyasal, biyolojik uyarılara uyumlu yanıt verirler. Buna karşılık

hücre içermeyen bir implant, enzimler tarafından bozunur ya da mekanik uyarılarla fiziksel özelliklerini kaybeder. Bu gerçek, doku mühendisliği yaklaşımlarının temel dayanağını oluşturur<sup>(3)</sup>.

Eklem kıkırdağı kayıplarında dokunun kendi kendini onarma kapasitesi oldukça sınırlıdır. Sınırlı onarım gerçekleşse de oluşan doku, biyomekanik olarak orijinal eklem kıkırdağı ile aynı özellikleri taşımayan fibröz kıkırdağıdır. Mükemmelle ulaşma içgüdüleriyle birçok araştırmacı, eklem kıkırdağı onarımında değişik tedavi seçenekleri üzerinde durmaktadır. Bu seçeneklerden doku mühendisliği yaklaşımları, diğer tıp dallarında olduğu gibi ortopedi ve travmatolojide de önemli yer tutmaktadır. Bu yazıda kıkırdak onanımında doku mühendisliğinin yeri ve konuya güncel yaklaşım gözden geçirilecektir.

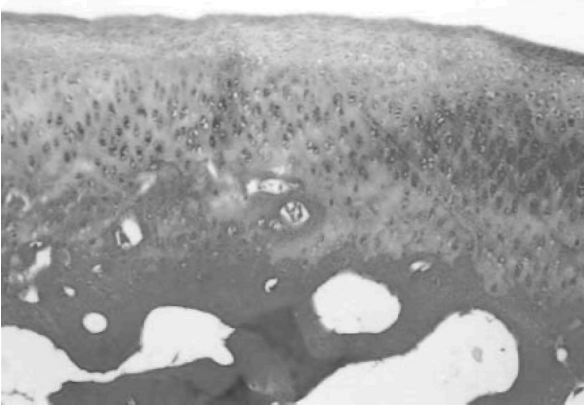


Şekil 1: Doku mühendisliğini tanımlayan şema. Elde edilen yeterli sayıda hücre uygun polimer ağıla birleştirilerek defektif bölgeye yerleştiriliyor.

## Eklem Kıkırdağının Yapısı ve Doku Mühendisliğindeki Önemi

Eklem kıkırdağı makroskopik olarak incelendiğinde, deformasyona direnç gösteren, sert, parlak bir yüzey olarak görünür. Işık mikroskopunda tek tip hücrenin bulunduğu, kan ve lenf damarları ile sinir uçlarının bulunmadığı bir doku göze çarpar (Şekil 2). Kas veya kemik gibi dokularla karşılaştırıldığında eklem kıkırdağı daha düşük metabolik aktivite gösterir. Tendon, ligament ve menisküs gibi diğer bağ dokulara benzer şekilde eklem kıkırdağı hücre, eklem sıvısı ve makromoleküler ağ iskeletinden oluşur. Yapısını ve mekanik özelliklerini ağırlıklı olarak bu ağdan alır. Kondrositler erişkin eklem kıkırdağının yalnızca % 1'ini oluştururlar. Su, eklem kıkırdağının yaş ağır-

\* Op.Dr., S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği Ankara \*\* Prof.Dr., Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Sağlık ve Rehberlik Merkezi, Ankara



Şekil 2 : Normal eklem kıkırdağını gösteren ışık mikroskobu preparatı (HE x40).

lığının yaklaşık %80'ini oluşturur. Su ile ağ moleküllerinin etkileşimi, dokunun mekanik özelliklerini belirler. Eklem kıkırdağı Tip 2, 6, 9, 10 ve 11 kollajenlerini içermekle beraber % 90-95'ini Tip 2 kollajen oluşturur. Tüm doku boyunca uzanan bu kollajen ağ, proteoglikanları da sararak dokunun bütünlüğünü sağlar ve gerilmeye karşı direnç gücünü verir. Kondrositlerle ağ arasındaki karşılıklı dayanışma, dokunun yaşam boyu bütünlüğünün korunmasını sağlar. Kondrositlerle ağ arasındaki ilişki, hücrelerin ağ makromoleküllerini sentezlemesiyle sınırlı değildir. Ağ, normal eklem hareketleri sırasında hücreyi mekanik hasardan korur ve hücrenin fenotipini sürdürmesini sağlar. Besinler, ağ moleküllerini sentezlemek için gerekli maddeler, bozulan ve yeni üretilen ağ molekülleri, metabolik artıklar ve sitokin, büyüme faktörü gibi hücre işlevlerinin düzenlenmesinde yardımcı moleküller ağdan geçerler. Ayrıca bu moleküller ağda depolanabilirler. Ağdan geçecek moleküllerin tipi ve geçiş hızı, yoğunluk ve içeriğine bağlıdır<sup>(4)</sup>.

Kondrositler, yaşam boyunca ağ makromoleküllerini yıkar veya yapar. Yapım ve yıkım arasındaki dengeyi kontrol eden dizin veya ilişki henüz çok iyi anlaşılamamıştır. Ağ, kondrositler için uyarı iletkeni görevini de görür ve eklem yüzeyinde mekanik yüklenmeyle oluşan sinyalleri kondrosite iletir. Kondrositler bu uyarılara yanıt olarak, otokrin ve parakrin mekanizma ile sitokinleri uyararak ağda değişiklikleri başlatır. Yer çekimsiz ortamlarda ve uzayda kültüre edilen kondrositler morfolojik değişikliğe uğrar. Bu nedenle eklem kıkırdağının normal bileşimini sürdürebilmesi için az da olsa hareket ve mekanik yüklenmeye gereksinimi vardır<sup>(4,5,6,7)</sup>

Kondrositler ve ağ arasındaki biyolojik ve mekanik etkileşim, kıkırdak onarımında planlanan çözüm yoluna karar vermede büyük önem taşır. Onarım için kullanılacak doğal ya da yapay malzemenin bu etkileşimi örneklenmesi gerekmektedir.

### Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kondral ve osteokondral kayıplarda, dokunun kendini yenileme yeteneğinin sınırlı olması, araştırmacıları hücreleri hasarlı veya kayıp bölgeye uygulama ve barındırma yollarını aramaya itmiştir. Kıkırdak doku mühendisliği bu sorunu çözmek için ortaya atılmış biyoteknolojik bir alandır. İlk kez 1977 yılında Green tarafından tanımlanmış ve 1980'li yıllarda güncellenmiştir<sup>(8)</sup>. 1994'te Brittberg ve ark. ilk klinik uygulama sonuçlarını bildirilmiştir<sup>(9)</sup>. Kıkırdak doku mühendisliğinde amaç, elde edilen yapay kıkırdağın normal eklem kıkırdağıyla aynı biyomekanik özelliklere sahip olmasıdır. Ancak bu şekilde eklem yüksek gerilme altında kaldığı in vivo ortamda normal işlevlerini sürdürebilir.

### Hücrenin Kökeni

Hücrelerarası işlevsel ağı oluşturmak için metabolik etkinlikleri açısından uygun hücrenin edinilmesi gerekmektedir. Chen ve ark., in vitro bir çalışmada, transplante edilen hücrenin sayısının sentezlenen ağ miktarını etkilediğini bildirmişlerdir<sup>(10)</sup>. Araştırmacılar çok farklı hücre seçenekleri üzerinde durmuşlardır: Erişkin eklem kıkırdağı kondrositi, periosteum ve perikondriumun kambiyum tabakasından elde edilen hücreler, mezenkimal kök hücreler, sinovyal hücreler, fetal ve embriyonik öncül hücreler (Fetal kök hücreler ve kondroblastlar) (Tablo 1). Tam kat eklem kıkırdağı kayıplarında onarım için hücre ile ağ bileşeni kullanılmaktadır. İyileşme süreci sadece bu sistemle değil, subkondral kemikten gelen diğer hücreler ve bunların sentezlediği sitokinlerle birlikte olmaktadır<sup>(n)</sup>. Bu nedenle kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kontrol edilemeyen birçok değişkenin varlığı göz ardı edilmemelidir.

### Kondrositler ve Kondroblastlar

Kıkırdak doku mühendisliğinde doğal olarak ilk akla gelen hücre tipidir. Birçok araştırmacı tarafından kolay elde edilebildiği için yaygın olarak farklı polimer ağlarla birlikte kullanılmıştır<sup>(11,12,24,25)</sup>. Erken dönemde kıkırdak yüzeyinde yeterli onarımı

**Tablo 1:** Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan hücre çeşileri ve ađ tipleri.

Hücre Çeşitleri	Polimer Tipleri
Enşkin ek en kıkırdağı kondrositi	Protein bazlı polimerler (Kollajen, fibrin)
Periosteum ve perikondrium kökenli hücreler	Karbohidrat bazlı polimerler (Aljinat, hiyalu-ranon, kitosan)
Mezenkimal kök hücreler	Sentetik polimerler (PGA, PLA, Karbon lif, PHBV)
Fetal ve embriyonik öncül hücreler	
Sinovyal hücreler	

sağladıkları gözlenmiştir. Ancak uzun dönem takiplerde aynı tatminkar sonuçlar elde edilmemiştir. Farklılaşmış dokudan üretildiklerinden yeterli çoğalma ve yeniden farklılaşmayı sağlamada yetersiz kaldıklarına değinilmektedir<sup>(n)</sup>. Öte yandan, kıkırdağın her katındaki kondrositin kendine özel farklı biyokimyasal, morfolojik özellikleri vardır. Tam kat kıkırdak örneği alarak bu dokudan kondrosit çözeltisi elde edip tek katlı kültür ortamında üretelim. Buradan elde edilen hücrelerin tekrar ağa aktarıldığında, farklı tipte makromolekül sentezleyen farklı biçimde ayrılmış hücrelerin birbiriyle karışacağı öngörülebilir. Bu durumda erken dönemde her şey yolunda gibi gözükürken, bir yıl sonra kıkırdak yüzeyinde kalsifiye adacıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılaşmış kondrositlerin zona özel hafızalarının varlığını kanıtlar<sup>(12)</sup>. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için, Kandel ve ark., farklı kıkırdak katlarından elde ettikleri kondrositleri in vitro olarak uygun katlarda üretmişler ve orijinal üç boyutlu eklem kıkırdağını elde etmişlerdir<sup>(13)</sup>.

Kondrositlerin kültüre edilerek, kıkırdak defektine enjekte edilip, üzerinin tibia proksimalinden alınan periost örtüsüyle kapatılması insanlarda uygulanan bir tekniktir<sup>(14)</sup>. Bu tekniğin uzun dönem takiplerinde yapılan kontrol artroskopilerde, onarılan kıkırdak yüzeyinde kalsifiye alanlar gözlenmiştir. Bunu yazarlar periostal flebe bağlamakla birlikte, yukarıda söz edilen nedenden dolayı da böyle bir sorun ortaya çıkmış olabilir.

**Perikondrial ve Periosteal Hücreler** Her iki doku da kondrojenik potansiyellerini kambiyum tabakalarındaki proliferasyon potansiyeli olan hücrelerinden alır<sup>(15)</sup>. Otojenik kökenli hücreler

kullanıldığında daha başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Ancak yine de bu hücrelerin uzun süre canlı kalmadığı ve zaman içinde iyileşme dokusu içindeki yoğunluklarının azaldığı bildirilmiştir. Bunun yanında subkondral kemikle bağlantıda olan hücrelerin kondrosit değil de osteoblastlara farklılaşabileceği bildirilmiştir<sup>(16)</sup>.

#### *Mezenkimal Kök Hücreler*

Kemik iliği stromasının multipotansiyel öncül hücreler içerdiği bilinmektedir. Burada yer alan mezenkimal kök hücreler uygun mikroçevrede osteosit, kondrosit, adiposit veya miyosit gibi farklı hücrelere dönüşebilmektedir. Bu hücrelerin potansiyel avantajları şunlardır:

- \* Doku kültüründe hızlı çoğalabildikleri için daha az sayıda hücre yeterli olmaktadır<sup>(17)</sup>.
- \* Kemik iliđinin elde edilmesi göreceli olarak daha kolaydır.
- \* Hücre yoğunluğu yaşla birlikte azalmakla birlikte, yaşlı kişilerde özellikle periosttan elde edilen hücreler yüksek metabolik etkinlik gösterirler; ancak ayrılaşma yetenekleri zamanla azalır<sup>(11,18)</sup>.
- \* Hem kemiğe hem de kıkırdağa dönüşebildikleri için osteokondral kayıpların onarımı için kullanılacak kompozit greftlerin yerine kullanılabilirler (18).

Yapılan in vivo çalışmalarda bu hücrelerin defekt bölgesinde farklılaşabilmeleri için dışarıdan yönlendirmeye gereksinim duyabildikleri gözlenmiştir<sup>(11)</sup>. İnsanlarda kıkırdak doku kayıplarında kullanımı henüz olmamakla birlikte, kemik kayıplarında kullanımı bildirilmiştir<sup>(19)</sup>.

#### *Sinovyal Hücreler*

Bu hücre tipinin kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılma fikri; iki hücre tipinin de aynı öncülden geldiği düşüncesi ve hem fetal hem de erişkin yaşamda aynı mikroçevrede benzer görevleri yerine getiren hücreler olmaları nedeniyle ortaya çıkmıştır. Uygun ađ ve TGF- (5 (transforme edici büyüme faktörü-beta) gibi büyüme faktörü ile birlikte kullanıldığında parsiyel kıkırdak kayıplarının onarımında kullanılacak bir hücre grubudur<sup>(20, 21)</sup>.

Periostal hücreler ve kondrositlerin ayrıştırılması birbirine benzeyen işlemlerle yapılmaktadır. Standart bir moleküler biyoloji laboratuvarının donanımı işlemler için yeterlidir. Kondrositlerin

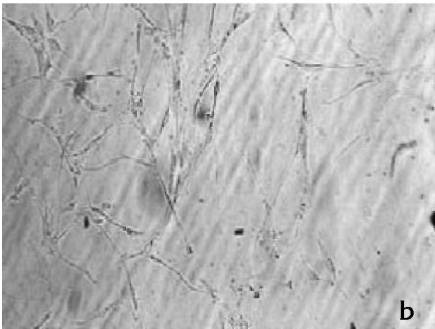
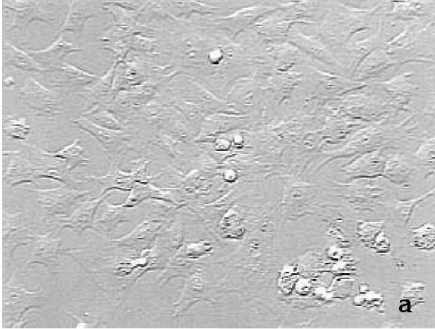
erken dönemde polimer yüzeylere yapışmaları ve ortama uyumlan oldukça iyidir (Şekil-3a, 3b). Bu hücreler ağ da sentezleyerek hiyalin benzeri iyileşme dokusu oluşturabilmektedirler. Ancak geç dönemdeki sorunların üstesinden gelebilmek için ileri araştırmalara gereksinim vardır<sup>(22, 23, M, 25)</sup>.

### Doku Kültürü Teknikleri

Kültüre edilen kondrositlerin ortamları ne kadar iyi olursa hücrelerin çoğalmaları ve fenotiplerinin süreğenliği o kadar iyi korunmaktadır. Belli başlı iki tip kültür tekniği bulunmaktadır: 1-Statik (Petri kabında) 2-Dinamik (Biyoreaktörlerde).

#### Statik Teknik

Bu teknikte, kıkırdak doku alınıp kollajenaz kullanılarak enzimatik ayrıştırılmadan sonra, içinde medium, fetal calf serumu, antibiyotik ve büyüme faktörü olan kültür plaklarına konur. Doku kültürü işlemi süresince plaklar vücut ısısındaki (37,2°C) inkübatörlerde bekletilir. Daha sonra hücrelerin ortamları iki veya üç günde bir değiştirilerek metabolik artıkların uzaklaştırılması ve besinlerin ortama eklenmesi sağlanır. Bu işlemde hücrelerin plak yüzeyinden ayrılması tripsin ile gerçekleştirilir. Yapılan pasajlarla yeterli hücre elde edilince ağ ile birleştirilir<sup>(25)</sup> (Şekil 3a).



**Şekil3: (a)** Flask yüzeyine yapışıp yayılmış kondrositlerin invert mikroskop görüntüsü. **(b)** Flask yüzeyine yapışmış periost kökenli osteoprogenitor hücrelerin invert mikroskopi görüntüsü.

### Dinamik Teknik

Doku kültürü fizyolojik şartların gerçekleştirildiği biyoreaktörlerde yapılır. Bu amaçla fizyolojik besinleri, sıvıları içeren bilgisayar kontrollü biyoreaktörler geliştirilmiştir. Biyoreaktörlerde mediyumun günde ortalama %50'si yenilenmektedir. Böylece metabolik atıklar daha hızlı uzaklaştırılmış ve yerine besinlerin geçişi hızlandırılmış olur. Biyoreaktörlerin de değişik türleri bulunmaktadır: Spinner flask, mikro taşıyıcılar, perfüzyon kültürleri, dönen duvar bioreaktörleri<sup>(26, 27, 28)</sup>.

Her iki teknikte de düşük hücre yoğunluğunda hücrelerin büyüme hızı artmaktadır. Ortamda hücre başına düşen besin miktarı azaldıkça hücre daha çok farklılaşmaktadır. Doğal olarak bu sorun statik kültürlerde daha çok görülür. Buna karşın dinamik uygulamaların maliyeti yüksektir ve daha özel laboratuvar donanımı gerektirmektedir<sup>(26, 28)</sup>. Yazarların daha çok statik kültürlerle deneyimi mevcuttur.<sup>(22,23,24,25)</sup>

Doku kültüründe elde edilecek hücre sayısı da önemlidir. Bir başka deyişle defekti onarmak için kullanılacak yapay dokuda hücre yoğunluğu ne olmalıdır? Önerilen hücre/ağ oranı  $4-10 \times 10^6 / \text{mm}^3$  dür. Biz çalışmalarımızda  $5-6 \times 10^6 / \text{mm}^3$  yoğunlukta

hücre kullanmaktayız<sup>(18-23-25)</sup>.

### Kullanılacak Ağın Tipi

Eklem kırıkdağı mekanik özelliklerini ekstraselüler ağdan almaktadır. Bu nedenle ağın orijinal eklem kırıkdağı ağını taklit etmesi gereklidir. Bu da ağ tipini en az hücre tipi kadar önemli kılar.

Buna dayanarak ideal ağ oluşturabilmek için üzerinde çalışılan malzemenin özellikleri Hunziker tarafından özetlenmiştir. Bu özelliklerin beş tanesini elde edebilen araştırmacılar tatmin edici sonuç elde etmiş demektir<sup>(1,29)</sup>:

- \* **Porozite:** Ağa ekilen hücrenin yapışabilmesi, migrasyonu, metabolik atıkların ve besinlerin taşınması için önemlidir. Porlar arasında bağlantılar olmalıdır.
- \* **Taşıyıcılık:** Büyüme faktörü destekli sistemlerde ağın bu tip molekülleri kontrollü salabilme özelliğinin olması gerekir.
- \* **Adezyon:** Ağ hücrelerin yapışmasını kolaylaştırmalıdır. Bu özellik hücrenin normal biyokimyasal ve salgı fonksiyonlarını oluşturabilmesi için gereklidir.
- \* **Biyobozunurluk:** Ağ, yeniden şekillenme süreci

için gerekli olan bozunma özelliğine sahip olmalıdır. Rezorbsiyon süresi kontrol edilebilmelidir. Bozunurken orijinal ağ oluşumuna izin vermemelidir.

- \* **Hacim Stabilesi:** Kullanılan ağ zamanla şişme veya büzüşme gibi hacim değişiklikleri göstermemelidir. Bu durumda eklem yüzünün düzlüğü ve pürüzsüzlüğü kaybolur.
- \* **Biyouyumluluk:** Ağ, konak dokuya yerleştirildiği zaman çevre dokuyla bütünleşebilmelidir. Bu da ancak biyo-uyumlu malzemelerle sağlanabilir. Greftle konak doku devamlılığı sağlanamazsa bütünleşme elde edilememiş demektir.
- \* **İnternal Yapışma:** Bir ağ boşluğa doldurulduğunda internal yapışma özelliği olmazsa boşluktan tekrar dışarı çıkar.
- \* **Elastiklik:** Ağın doğal sertliği de bu açıdan önemlidir. Özellikle eklemde bir takım kuvvetlere direnebilmesi gerekir. Ek olarak mekanik özellikler açısından konak dokuya benzemelidir.
- \* **Cerrahi Tekniğe Uygunluk:** Klinik uygulamalarda cerrahi teknik olarak artroskopik seçilecekse, başta sıvı formunda olup yerleştirildikten sonra katılaşması istenir. Ancak, bu esnada hacim değişikliğine uğramamalıdır. Artrotomik olarak uygulanacaksa, katı olması tercih edilir. Böylece ağ defektif bölgeye kolayca sıkıştırılabilir ve eklem yüzeyinde kalan fazla kısmı tıraşlanabilir.

Sayılan bu özellikleri elde edebilme içgüdüleri araştırmacıları doğal yada sentetik çok farklı malzemeler üzerinde çalışmaya itmiştir.

### Doğal Polimerlerden Oluşan Ağlar

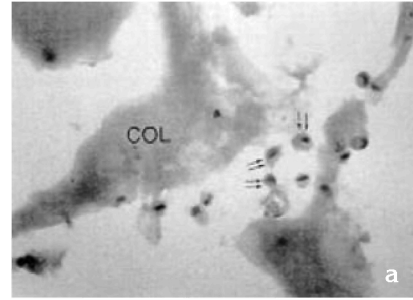
Doğal polimerlerin osteokondral kayıpların tedavisinde kullanılması fikri ilk kez Speer ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır. Tavşan diz eklemlerinde oluşturulan osteokondral kayıplarda sünger formunda kollajen kullanmışlar ve tamir dokusunun orijinal eklem kıkırdağına benzer özellikler taşıdığını ifade etmişlerdir (30). Doğal polimerleri kabaca protein bazlılar ve karbohidrat bazlılar olarak ikiye ayırabiliriz.

#### Protein Bazlı Polimerler

Kollajen, en eski olmanın yanında üzerinde en çok çalışılan protein yapısındaki polimerlerdendir. Kondrositleri altı hafta boyunca kollajen jel içinde takip eden bir grup araştırmacı, hücrelerin ortama iyi adapte olduklarını ve tip-2 kollajen, proteoglikan

gibi ağ makromoleküllerini sentezleyebildiklerini göstermişlerdir<sup>(31)</sup>. Nehrer ve ark., yapmış oldukları in vitro çalışmada, Tip 1 kollajen ağ ile Tip 2 kollajen ağı karşılaştırmışlardır. Her iki ağa da kondrositleri ekmişlerdir. İki haftalık süre sonunda Tip 2 kollajenden yapılan ağda kondrosit morfolojisi korunmuş, DNA içeriği artmış, glikozaminoglikan yapımı daha fazla olmuştur<sup>(32)</sup>. Frenkel ve ark., kıkırdak doku mühendisliğinde ağ modeline yeni bir görüş getirerek farklı fiziksel yapıda iki katlı bir iskelet kullanmışlardır. İlk kat subkondral kemikle ilişkili olan, hücre beslenmesini sağlayan moleküllerin geçişine izin veren yoğun kollajen katıdır. İkinci kat ise kondrositlerin büyümesini ve metabolizmasını destekleyen poröz kollajen katıdır. Tavşan modelinde deney gruplarında hiyalin benzeri kıkırdak elde edildiği gösterilmiştir<sup>(33)</sup>. Biz osteokondral kayıpların rejenerasyonunda yeni bir yöntem kullanılarak, kalsiyum fosfat-kollajen kompozitini ağ olarak kullandık (Şekil4a, 4b). Bu in vitro denemede normalde bir günde degrade olan kollajenin kalsiyumla daha stabil davranarak iki haftada bozunduğunu gözlemledik. Ayrıca, ortamda (normalde olmayan) sülfürün bulunduğunu saptadık. Bu da sülfüre glukozaminoglikanların oluştuğunun dolaylı göstergesidir. Sonuçta, bu kompozit osteokondral kayıpların tedavisinde doku mühendisliği amacıyla kullanılabilme potansiyeli olan bir yapay ağıdır<sup>(23)</sup>.

Basitçe denatüre kollajen diyebileceğimiz jelatin denenen bir başka proteindir. Kondrosit gelişimini



Şekil 4: (a) Hidroksiapatit-kollajen iskeletine ekilmiş kondrositlerin ışık mikroskopundaki (HE, X20) ve (b) tarama elektron mikroskopundaki görünümü (X2000).



2004 • Cilt: 3 Sayı: 3-4

destekleyen bazı çalışmalar olmakla birlikte<sup>(34)</sup>, sub-kondral kemik gibi vaskülerize dokularda inflamatuvar reaksiyon oluşturduğu bilinmektedir<sup>(11)</sup>.

Fibrin, kan adı verilen sıvı bağ dokunun ekstraselüler ağının çoğunluğunu oluşturan fibrinojenin polarize formudur. Fibrinojen damar dışına çıkınca yada patolojik durumlarda polimerize olarak fibrine dönüşür. Fibrin mekanik olarak kuvvetli değildir, ancak ekstra-vasküler kompartmanda doku iyileşmesine yardımcı olur. Bu temel bilgilere dayanarak birçok araştırmacı fibrini boş olarak, hücre ile yada büyüme faktörü ile birlikte değişik doku mühendisliği uygulamalarında kullanmışlar ve kırıkta doku mühendisliği için de uygun olabileceğini ifade etmişlerdir<sup>(35,36)</sup>. Ancak sonradan yapılan çalışmalarda kollajende olduğu gibi bu moleküle karşı da immün reaksiyon geliştiğini bildiren çalışmalar yayınlanmıştır<sup>(37)</sup>.

#### Karbohidrat Bazlı Polimerler

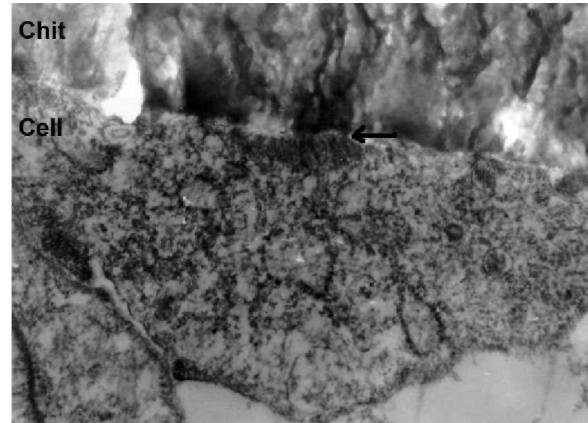
Bu grup içinde yer alan agaröz, temelde galaktoz içeren ve deniz ürünlerinden elde edilen bir polimerdir. İnert oluşu ve mekanik olarak in vitro iyi sonuçlar alınmasıyla kabul gören bir polimerdir<sup>(38)</sup>. Ancak memelilerde bu polimeri yıkacak sistemlerin yetersiz oluşu degradasyon sorununu birlikte getirmiştir<sup>(39)</sup>.

Aljinat kalsiyum iyonlarıyla polimerize olan karbohidrat yapısında jeldir. Yapılan in vitro çalışmalarda aljinat jelin kırıkta doku mühendisliğine uygun bir polimer olduğu bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin bu polimere ekildiğinde kondrosite farklılaştığı gözlenmiştir<sup>(40)</sup>. Buna karşın yapılan in vivo çalışmalarda, yabancı cisim dev hücrelerle karakterize immün reaksiyon oluşturduğu bildirilmiştir<sup>(41)</sup>.

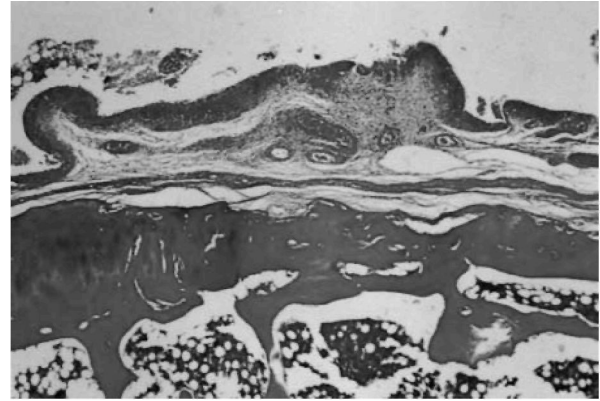
Hiyaluronan eklem kırıkta ağının karbohidrat yapısındaki bir bileşenidir. Orijinal haliyle implante edilebildiğinde oldukça biyoyumlu bir moleküldür. Ancak stabil bir ağ olabilmesi için çapraz bağlanması gerekmekte, bu da biyo-uyumluluğunu etkilemektedir<sup>(11)</sup>. Bu nedenle hiyaluronanın farklı kimyasal yapıda daha stabil formlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır<sup>(42)</sup>.

Kitosan kabuklu deniz hayvanlarında bulunan kitinden elde edilen doku mühendisliğinin değişik alanlarında denenmekte olan bir polimerdir. Moleküler yapısı hiyaluronik asit ve glukozaminoglikana benzer. Su çekip şişme özelliği olan bu polimerin yaptığımız in vitro çalışmada kondrosit-

lerin yapışması için çok uygun olduğu sonucuna vardık (Şekil 5) (24). Kitosan, Hunziker'in tanımladığı porozite, taşıyıcılık, adezyon, biyobozunurluk, elastiklik özelliklerini taşıması nedeniyle bizi çok yöreklendirdi. Buna karşın, tavşanlarda yaptığımız in vivo çalışmada yabancı cisim dev hücreleri ile karakterize immün reaksiyonu gözlemlememiz polimere güvenimizi sarstı (Şekil 6). Bunun için kitosanın yeterince saflaştırılmadığı sonucuna vararak, daha saf kitosanla ve farklı hayvan modelleriyle yapılan çalışmaların gerektiği sonucuna vardık<sup>(25)</sup>.



Şekil 5: Kondrositin kitosana yapıştığını gösteren transmisyon elektron mikroskobu fotoğrafı. Ok kitosana komşu hücre duvarındaki bağlantı kompleksini (desmozom) gösteriyor (x20000).



Şekil 6: Kitosana karşı gelişen aşırı sinovit ve pannus oluşumu (HE, x40).

#### Sentetik Polimerlerden Oluşan Ağlar

Sentetik polimerler özellikle ortopedik cerrahide fiksasyon ve dikiş materyali formlarında güvenle ve yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(43)</sup>. Kırıkta doku mühendisliğinde de hücrelerin yerleştirildiği üç boyutlu iskeleti oluşturmak için çok değişik sentetik polimer seçenekleri üzerinde durulmuştur.

Poli a-hidroksi asitler (poliglikolik asit, polilaktik asit) ortopedik cerrahide oldukça yaygın klinik uygulamaları olan polimerlerdir. O nedenle, biyoyumlu bu polimerler kıkırdak doku mühendisliği için yapılan deneysel çalışmalarda sıkça denemişlerdir. Bu grup polimerler kütleli bozunma özelliğindedirler. Bu durumda ortama aniden büyük miktarda yıkım ürünü salınabilir. Polimerin molekül ağırlığına göre bozunma süresi değişir. Ortaya çıkan yıkım ürünleri asidiktir. Eğer çevre doku iyi kanlanamıyorsa ve metabolik aktivitesi düşükse biriken artıklar inflamatuvar reaksiyona neden olabilmektedir<sup>(44)</sup>. Yıkım ürünü olarak karşılaştırıldığında, polilaktik asitin (PLA) ürünü olan laktik asit, poliglikolik asitin (PGA) ürünü olan glikolik aside göre daha biyoyumludur. Kondrositler, 12 günlük inkübasyon esnasında 2mg/ml konsantrasyondaki laktik asiti tolere ederler. Ancak, aynı konsantrasyondaki glikolik asit hücre metabolizmasını etkiler. Kondrositlerin laktik asiti daha rahat tolere edebilmelerinin nedeni, normalde de anaerobik metabolizmayı kullanmalarındır<sup>(45)</sup>. Doku mühendisliğinde kullanılan bir başka poli-a-hidroksi asit, e-kaprolaktondur. Tendon ve kemik kayıplarında ümit verici sonuçlar elde ettiğimiz bu polimerin biyo-uyumluluğu dikkat çekicidir<sup>(46,47)</sup>. Bu nedenle, kıkırdak doku mühendisliğinde de ağ olmaya aday bir polimerdir.

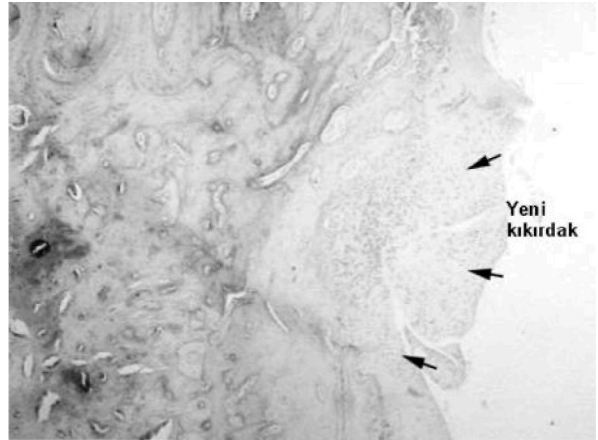
Brittberg ve ark, karbon lifi ağ olarak kullanıp, kondrositlerle birleştirerek tavşanların dizlerinde oluşturdukları osteokondral kayıplara yerleştirmişlerdir. Karbon lif kullanılan gruplarda ilk 12 hafta içinde hiyalin benzeri kıkırdak oluşmuş ancak, 52. haftada bu kıkırdığın kalitesi bozulmuştur. Karbon lifin daha sert olduğunu ve kıkırdak dokunun viskoelastik özelliklerini taşımadığını savunmuşlardır<sup>(48)</sup>. Karbon lif tek başına insan kıkırdak kayıplarında kullanılmış ve yabancı cisim reaksiyonu yaparak sinovite neden olduğu gözlenmiştir<sup>(49)</sup>.

Kıkırdak doku mühendisliğinde potansiyel kullanımı olan bir başka polimer de PHBV (poli [3-hidroksibutirik asit-ko-3-hidroksivalerik asit]) dir. İn vitro ortamda bakterilere sentez ettirilen bu biyolojik ürün daha sonra bazı kimyasal işlemlerden geçirilerek üç boyutlu matris haline getirilir. Yaptığımız çalışmalarda, kemik doku mühendisliğinde osteoblastların çoğalması ve ayrışmasında etkin olduğunu in vitro ve in vivo olarak gözlemledik. Buradan yola çıkarak tavşan diz ekleminde oluşturulan osteokondral kayıplara, PHBV ağına kondrosit

ekerek elde ettiğimiz yapay kıkırdığı yerleştirdik. Sonuçta deney gruplarında boş bıraktığımız kontrol gruplarına göre makroskopik ve mikroskopik olarak daha kaliteli bir kıkırdak benzeri dokunun oluştuğunu izledik (Şekil 7, 8). Buna karşın komşu dokuda az da olsa yabancı cisim reaksiyonu mevcuttu<sup>(50,51)</sup>.



Şekil 7: Tavşanın her iki dizinde oluşturulan standart osteokondral kayıp bir tarafta boş bırakılırken (Kalın ok), diğer tarafta poli hidroksi-bütirat+kondrositten oluşan yapay kıkırdak ile onarılmıştır (İnce ok). 8. haftada her iki dizin makroskopik görüntüsü.



Şekil 8: Poli hidroksi-bütirat+kondrositten oluşan yapay kıkırdığın in vivo mikroskopik görüntüsü. Yapay kıkırdığın çevre dokuya iyi entegre olduğu ancak yine de subkondral kemikte yabancı cisim reaksiyonu dikkat çekiyor (HE, x25)

## Büyüme Faktörleri ve Kıkırdak Doku Mühendisliği

Büyüme faktörleri, diğer dokularda olduğu gibi kıkırdak onarımı için de vazgeçilmez makromoleküllerdir. Yapılan bir çalışmada normal ve artrit dizlerde büyüme faktörü yanıtı incelenmiştir. Bu ilginç çalışmada, patolojik dizlerdeki kondrositlerin, kondrogenezisin vazgeçilmez büyüme faktör-



lerinden insülin benzeri büyüme faktörü-1' e yanıt vermediği görülmüştür. Buna karşın transforme edici büyüme faktörü- , interlökin-1'in katabolik etkisini inhibe ederek kırıkta onarımını arttırmıştır. Kemik morfogenetik proteini-2 ise, interlökin-1'in yokluğunda bu etkisini göstermiştir<sup>(52)</sup>. Bir başka çalışmada ise, transforme edici büyüme faktörü-alesinin kırıkta yapımını uyardığı gösterilmiştir<sup>(53)</sup>. Hücrelerin büyüme faktörlerine yanıtı yaş ilerledikçe azalmaktadır. Genç yaşta kişilerdeki kondral veya osteokondral kayıpları büyüme faktörleriyle tedavisi umut vericidir. Ancak bu tedavi yaklaşımı dikkatle yapılacak birçok araştırmayı gerektirmektedir. Çünkü, büyüme faktörleri eklem içinde sadece kırıkta değil, tüm dokuları etkilemektedir<sup>(54)</sup>.

### Greftin Tespiti

Otolog kırıkta transplantasyonunun öncüsü Brittberg ve ark., tibia proksimalinden aldıkları periostal grefti defekt yüzeyine diktikten sonra, bunun altına kondrosit süspansiyonunu enjekte etmektedirler. Bu sistem çoğunlukla çalışmakla birlikte, az da olsa karşı eklem yüzeyinin sürtmesiyle ayrılan periostal flep kenarından kondrositler eklem akabilmektedir<sup>(14)</sup>. Bu nedenle araştırmacılar farklı çözümler bulmaya çalışmaktadır. Bunlardan biri, iki bölümden oluşan polilaktattan yapılmış bir sistemdir. Birinci bölüm polimer ağıdır ve buna in vitro olarak hücre ekilir. Buna bağlı olan ikinci bölüm ise subkondral kemiğe sabitlenen çapadır. Ancak bu sistemi geliştirmek için deneysel çalışmalar sürmektedir<sup>(12)</sup>.

### Sonuç

Otolog kırıkta transplantasyonunun orta dönem izlem sonuçları, kırıkta doku mühendisliğinin bileşenlerinden olan hücre ve doku kültürü sorununun, büyük oranda halledildiğini gösteriyor. Burada, geriye üç boyutlu ağ sorunu kalıyor. Yukarıda tartışıldığı gibi henüz Hunziker'in tanımladığı özellikleri büyük oranda taşıyan bir ağ elde edilememiştir. Bunun için yeni polimerlerin denenmesinin yanında, denenmiş olan polimerlerin yeni üretim şekillerinin ve yeni kompozitlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu sistemde, iyi kontrol etmek kaydıyla, büyüme faktörlerine de yer verilmesidir.

### Kaynaklar

1. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. J Bone J Surg Am 1997, 79-A(6):612-32.
2. Lexer E: Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by free plastic operations. Surg Gynecol Obstet 1908, 6:601-9.
3. Vacanti CA, Vacanti JP: The science of tissue engineering. Orthop Clin North Am 2000, 31(3):351-5.
4. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part I: Tissue design and chondrocyte interactions. J Bone J Surg Am 1997, 79-A(6):600-11.
5. Freed LE, Langer R, Martin I, Pellis NR, Vunjac-Novakovic G: Tissue engineering of cartilage in space. Proc Natl Acad Sci 1997, 94(25): 13885-90.
6. Freed LE, Vunjac-Novakovic G: Microgravity tissue engineering. In Vitro Cell Dev Biol 1997, 33(5):381-5.
7. Steinmeyer J, Knue S, Raiss RX, Pelzer I: Effects of intermitently applied cyclic loading on proteoglycan metabolism and swelling behavior of articular cartilage explants. Osteoarthritis Cartilage 1999, 7 (2): 155-64.
8. Green WT: Articular Cartilage Repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. Clin Orthop 1977, 124:237-50.
9. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994, 331(14):889-95.
10. Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Sah RL: Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro. J Orthop Res 1997, 15(6):791-802.
11. Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 2001, 10(6):432-63.
12. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE: Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions. Clin Orthop 1999, 367S: 176-85.
13. Kandel RA, Boyle J, Gibson G, Cruz T, Speagle M: In vitro formation of mineralized cartilaginous tissue by articular chondrocytes. In Vitro Cell Dev Biol 1997, 33(3):174-81.
14. Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. Clin Orthop 1999, 367S:147-56.
15. Ito Y, Fitzsimmons S, Sanyal A, Mello M, Mukherjee N, O'Driscoll S: Localization of chondrocyte precursors in periosteum. Osteoarthritis Cartilage 2001, 9(3): 215-23.
16. Ostrand E, Goomer C, Tontz D, Khatod M, Harwood D, Maris W: Donor cell fate in tissue engineering for articular cartilage repair. Clin Orthop 2001, 389:228-37.
17. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. Science 1997, 276(5309):71-4.
18. Freed LE, Martin I, Vunjac-Novakovic G: Frontiers in tissue engineering: In vitro modulation of chondrogenesis. Clin Orthop 1999, 367S:46-58.
19. Quarto R, Mastrogiacorno N, Cancedda M, Kutepov A, Mukhachev B, Lavroukov A: Repair of large one defects with use of autologous bone marrow stromal cells. N Engl J Med 2001, 344(5):385-86.
20. Pacifici E, Koyama A, Iwamoto Y, Gentili E: Development of articular cartilage: What do we know about it and how may it occur? Connect Tissue Res 2000, 41(3): 175.

21. Nishimura E, Solchaga I, Caplan A, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B: Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1999, 42(12):2631-7.
22. Korkusuz F, Özkul A, Burgu İ: Isolation and in vitro reproduction of periosteal cells. *Turk J Med Res* 1993, 11(3):107-11.
23. Yaylaoğlu MB, Yıldız C, Korkusuz F, Hasırcı V: A novel osteochondral implant. *Biomaterials* 1999, 20(10):1513-20.
24. Şenköylü A, Şimşek A, Şahin İF, Özoğul C, Meneşe S, Denkbaş E, Pişkin E: Interaction of cultured chondrocyte with chitosan scaffold. *J Bioactive Comp Polym* 2001, 16(6):32-6.
25. Şenköylü A: Tavşanların diz eklemlerinde oluşturulan osteokondral kayıpların yapay kıkırdak dokusu ile tedavisinde ağ olarak kitosan kullanımı. *Clzmanlık Tezi*, 2001.
26. Freed LE, Vunjac-Novakovic G, Langer R: Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem* 1993, 51(3):257-64.
27. Lebaron RG, Athanasiou KA: Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials* 2000, 21(24):2575-87.
28. Vunjac-Novakovic G, Martin I, Obradovic B, et al: Bioreactor cultivation conditions modulate the compositions and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res* 1999, 17(1):130-8.
29. Hunziker EB: Biologic Repair Of Articular Cartilage: Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop* 1999, 367S: 135-46.
30. Speer DP, Chvapil M, Volz RG, Holmes MD: Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clin Orthop* 1979, 144:326-35.
31. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ona K: Chondrocytes embedded in collagen gel maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop* 1984, 186:231-9.
32. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, et al: Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997, 38(2):95-104.
33. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman M, Panchence JM: Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone J Surg Br* 1997, 79-B(5):831-6.
34. Ponticello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP: Gelatin based sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res* 2000, 52(2):246-55.
35. Itay S, Abramovic A, Nevo Z: Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop* 1987, 220:284-301.
36. Hominga GN, Buma P, Koot HWJ, Van Der Kraan PM, Van Den Berg WB: Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 1993, 64(4):441-5.
37. Haisch A, Loch A, David J, Pruss E, Hansen E, Sittinger D: Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering. *Med Biol Eng Comp* 2000, 38(7):686-9.
38. Buschmann M, Gludzband I, Glodzinsky A, Kimura J, Hunziker E: Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 1992, 10(6):745-58.
39. Rahfoth B, Weisser J, Stempkof D, Aigner T, Vondermark K, Brauer R: Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cart* 1998, 6(1):50-65.
40. Diduch D, Jordan L, Mierisch G, Ballian G: Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000, 16(6):571-7.
41. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F: Articular cartilage repair in rabbits by suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000, 21(8):795-801.
42. Bulpitt P, Aeschlimann D: New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in formation of novel biocompatible hydrogels. *J Biomed Mater Res* 1999, 47(2):152-69.
43. Yetkin H, Şenköylü A, Cila E, Öztürk AM, Şimşek A: Biodegradable implants in orthopaedics and traumatology. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2000, 30(3):297-301.
44. Hutmacher DW: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000, 21(24):2529-43.
45. Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, et al: Resorbable polyesters in cartilage engineering: Affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996, 33(2):57-63.
46. Şenköylü A, Ural E, Kesenci K, Şimşek A, Ruacan Ş, Pişkin E: Poly(D,L-lactide/ caprolactone)/hydroxyapatite composites as bone filler: An in vivo study in rats. *Int J Artif Organs* 2002, 25(12):1174-9.
47. Kazımoğlu C, Bölükbaşı S, Kanatlı U, Şenköylü A, et al: A novel biodegradable PCL film for tendon reconstruction: Achilles tendon defect model in rats. *Int J Artif Organs* 2003, 26(9):804-12.
48. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L: Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 1996, 326:270-83.
49. Meister K, Cobb A, Bentley G: Treatment of painful articular cartilage defects of patella by carbon fiber pads. *J Bone Joint Surg Br* 1998, 80-B(6): 965-70.
50. Torun GK, Ber S, Korkusuz F, Hasırcı V: PHBV based tissue engineering matrices. *J Mater Sci Mater Med* 2003,
51. Köse GT, Korkusuz F, Korkusuz P, Hasırcı V: In vivo tissue engineering of bone using PHBV and collagen. *Tissue Eng* 2004, 10(7-8):1234-50.
52. Van den Berg WB, Van den Kraan JH, Scharstuhl A, Van Beuningen H: Tissue engineering, cells, scaffolds and growth factors. *Clin Orthop* 2001, 391S: 244-251.
53. Hunziker E, Driesang I, Morris D: Chondrogenesis in cartilage repair is induced by the members of Transforming growth factor- superfamily. *Clin Orthop* 2001, 391S: 171-81.
54. O'Connor WJ, Botti T, Khan SN, Lane JM: The use of growth factors in cartilage repair. *Orthop Clin North Am* 2000, 31(3): 399-410.

