

“TRANSFORMING” BÜYÜME FAKTÖRÜ β -1 EMDİRİLMİŞ, BİYOLOJİK YIKILABİLİR POLİHİDROKSİBÜTİRAT-CO-HİDROKSİVALERAT ÇUBUKLAR: KONTROLLÜ SALINIM SİSTEMİNİN KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ahmet TERZİOĞLU, Gürçan ASLAN, Doğan TUNCALI, Şahende ELAGÖZ,
Vasıf HASIRCI, İhsan GÜRSEL

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, II. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı, Sivas, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü, Biyoteknoloji Araştırma Ünitesi, Ankara

ÖZET

Bu çalışmanın amaçları: 1. İki farklı ‘Transforming’ Büyüme Faktörü b-1 (TGF β -1) dozu içeren ve biyolojik poliyesterlerden yapılmış yeni bir kontrollü salınım sistemi hazırlamak, 2. Bu sistemin periosteal, kortikal ve intramedüller kemik iyileşmesine etkilerini araştırmaktır.

TGF β -1 kemik osteogenezinde çok iyi bilinen bir sinyal taşıyıcısıdır. Bu madde bakteri kökenli, biyo-uyumlu, biyolojik olarak yıkılabilir ve toksik olmayan polihidroksibütirat-co-hidroksivalerat (PHBV) çubuklarına emdirildi. Otuz adet sıçanın her iki tibiasına delikler açıldı ve onbeşer sıçandan oluşan iki grup oluşturuldu. Kontrol amaçlı olarak üçüncü bir grup ise tedavi edilmemiş 5 sıçandan oluşmaktaydı. Aynı boyutlardaki 5.0 ng ve 20.0 ng TGF β -1 içeren çubuklar sırasıyla Grup 1 ve Grup 2’deki sıçanların sağ tibialarına yerleştirildi. TGF β -1 içermeyen PHBV çubukları ise fantom olarak sol tibia defektlerine yerleştirildi. Onbeş günlük aralarla sıçanlar kurban edildi ve toplam bir ay sonunda elde edilen spesimenler makroskopik, histopatolojik ve radyolojik olarak değerlendirildi.

TGF β -1 ile muamele edilmiş sıçanlarda, düşük doz içerenlerde daha yavaş olmak üzere, radyografik olarak tam iyileşme gözlemlendi. Histopatolojik bulgular radyolojik bulguları desteklemekteydi. TGF β -1 emdirilmiş taşıyıcı materyallerin kemik iyileşmesinde hızlandırıcı etkisi olduğu ve çok az yabancı cisim reaksiyonu oluşturduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kemik iyileşmesi, büyüme faktörü, deneysel, biyoyakımlı kontrollü ilaç salım sistemi

SUMMARY

Transforming Growth Factor β -1 Incorporating Biodegradable Polyhydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate Rods: Effects of Controlled Delivery System on Bone Healing

The aims of this study are; 1. To prepare a novel local delivery system, made of biological polyesters, incorporating two different doses of TGF β -1, 2. To determine its effectiveness on periosteal, cortical and intramedullar bone healing.

Transforming growth factor beta-1 (TGF β -1), which is a proven prominent messenger in bone osteogenesis, has been adsorbed to microbially synthesized natural, biodegradable, biocompatible, and non-toxic polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) rods.

Burr-holes were created on both tibias of 30 rats. These were divided into two groups of fifteen subjects. An additional third group, consisting of five rats, was used as non-treated controls. The rods of the same dimensions containing 5.0 ng and 20.0 ng of TGF β -1 were implanted into the defects of the right legs in Groups 1 and 2 respectively. Plain PHBV rods were implanted in the left legs, which was used as phantoms. In fifteen day intervals the rats were sacrificed and at the end of one month, the specimens were analyzed macroscopically, histo-pathologically, and radiologically.

The radiographs of the subjects treated with TGF β -1 showed complete healing. However, this was observed to be much slower in low-dose treated implants. Histo-pathologic evaluation also supported the radiological findings. It was concluded that the delivery material treated with TGF β -1 have an enhancing effect on bone healing with a minimum foreign body reaction.

Key Words: Bone healing, growth factor, experimental, biodegradable controlled drug release system

GİRİŞ

Kemik iyileşmesi birçok internal ve eksternal faktörlerden etkilenen komplike biyolojik, biyomekanik ve biyokimyasal bir olaydır. 'Transforming' Büyüme Faktörü β -1 (TGF β -1), kemik morfojenik protein ve insüline benzer büyüme faktörleri, kemik iyileşmesini, yeniden yapılandırılmasını ve rezorpsiyonunu arttıran lokal aktif mediatörlerdir¹. Her ne kadar bu proteinlerin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılammışsa da, yarılanma ömürlerinin genellikle kısa olduğu ve etkilerinin kemik iyileşmesi bölgesine sınırlı olduğu bilinmektedir. TGF β -1'in belli hücre tipleri ve tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, buna karşılık yeni kıkırdak ve kemik yapımını uyardığı bildirilmiştir².

Poli-3-hidroksibütirat (PHB) ve farklı hidroksivalerat oranları ile oluşturuğu ko-polimerleri (PHBV), polihidroksialkanoatlar (PHA) olarak bilinen jenerik mikrobik polimer grubunun en sık karşılaşılan ve kullanılan üyeleridir (Gürsel I. Ph. D. Tezi, 1995). Piezoelektrik özellikleri nedeniyle yeni kemik yapımını uyaran eşsiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, bu yıkılabilir, biyo uyumlu ve toksik olmayan poliyesterler, ortopedi ve plastik cerrahi gibi dallarda gittikçe artan bir ilgi odağı haline gelmişlerdir³⁻¹³.

Son yıllarda, PHA'ların yani sira polilaktik asit polimerlerinin (PLA) yeni biyomedikal cihazların yapımında kullanılmasına oldukça sık rastlanır olmuştur. Ancak PLA'ların kullanımlarında ortaya çıkabilen, zayıf mekanik özellikler, lokal asidoz ve tedavi bölgesindeki doku nekrozu nedenleriyle uzun süreli bazı uygulamalarda uygunsuz bulunmuşlardır. Bu nedenle PHA'lar bu alandaki kullanımlar için en yüksek potansiyele sahip malzemelerdirler.

Bu çalışmanın amaçları: 1. İki farklı 'Transforming' Büyüme Faktörü β -1 (TGF β -1) dozu içeren ve biyolojik pliyesterlerden yapılmış yeni bir kontrollü salınım sistemi hazırlamak, 2. Bu sistemin periosteal, kortikal ve intramedüller kemik iyileşmesine etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Molekül ağırlıkları 400.000 ve 750.000 D olan ve ağırlığın bir fraksiyonu olarak 22 hidroksivalerat (PHBV22) içeren poli (3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivalerat) Aldrich Chemical Company (ABD)'den, TGF β -1 ise Sigma Company (ABD)'den satın alındı.

Bu çalışma için hayvan etik komitesi izni alınmıştır. Ağırlıkları 300-350 gr olan toplam 35 erkek Sprague-Dawly sıçanı kullanıldı. Tedavi uygulanan Grup 1 ve 2 15'er, kontrol grubu olan Grup 3 ise 5 sıçandan oluşturuldu.

TGF β -1 Emdirilmiş PHBV22 İmplantlarının Hazırlanması

İki gram polimer tozundan elde edilen PHBV22'nin bir kısmı kloroform içerisinde eritilerek bir havana döküldü. Geri kalan toz ise bu visköz polimer solüsyonuna kontrollü bir şekilde eklendi. Elde edilen materyal homojen ve akışkan olmayan bir macun kıvamına gelene kadar havanda dövüldü. Bu macun 10 x 0.3 x 0.3 cm boyutlarında özel olarak hazırlanmış cam bir kalıba uygulandı. Kalıp oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakıldı ve katılaşması sağlandı.

TGF β -1 solüsyonu elde edilen bu çubukların yüzeyine uygulandı. Adsorbsiyon ve kurumayı takiben, polimer solüsyonuna batırılarak çubuk yüzeyinin yeniden kaplanması sağlandı. TGF β -1 miktarı, Grup 1 ve 2 için sırasıyla 5 ng ve 20 ng olarak ayarlandı. Bu hazırlanan çubuklardan 30 \pm 2.0 mg ağırlığında, 0.3x 0.3x 0.1 cm boyutlarında implantlar elde edildi.

Cerrahi Teknik

Sıçanlar intramusküler ketamin (10 mg/kg) ve sodyum pentobarbital (18 mg/kg) ile uyutuldu. Sıçanların her iki tibia ön yüzlerine elektrikli dril kullanılarak implantlar büyüklüğünde 'burr-hole'lar açıldı. TGF β -1 içermeyen fantom PHBV22 implantlar sol, iki farklı doz içeren (Grup 1 ve 2 için sırasıyla 5 ve 20 ng) implantlar ise sağ tarafa yerleştirildi. Grup 3'teki sıçanlara da ilk iki gruptaki gibi 'burr-hole'lar açıldı ancak bu deliklere herhangi bir implant yerleştirilmedi. Bu grup doğal iyileşme için kontrol olarak kullanıldı.

Sıçanlar farklı kafeslerde normal diyetle beslenirken, doğal günlük aktivitelerine de izin verildi. Her bir gruptan 7'şer sıçan 2 haftalık aralıklarla sakrifiye edildi ve bir ay sonunda çalışma tamamlandı. Direkt grafilere ek olarak her iki bacadaki tüm tibia rezeke edildi ve histopatolojik incelemeye alındı.

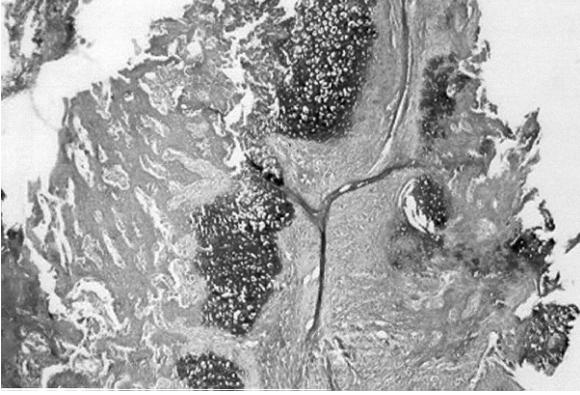
Histopatolojik ve Radyolojik Değerlendirme

Spesimenler %10'luk formik asit solüsyonunda fikse edilerek 1-2 hafta kadar dekalsifiye edildi. Daha sonra sodyum sülfat içerisinde bekletildi. Etanolde dehidrate edilen spesimenler daha sonra parafinle bloklandı. 5-7 μ m kalınlığındaki transvers kesitler, implantları da içerecek şekilde elde edildi ve Hematoksilin-Eozin ile boyandı. Işık mikroskopu (Olympus BH-7) kullanılarak fotomikrograflar elde edildi.

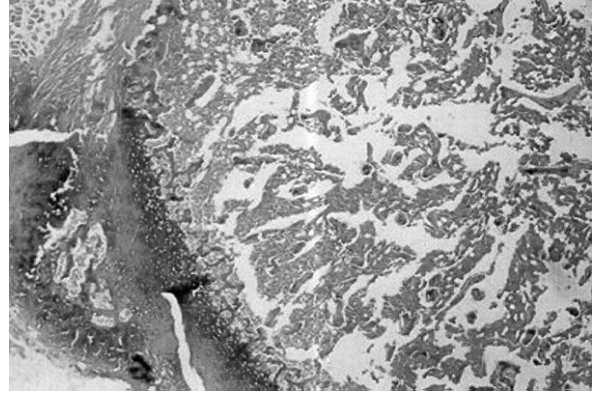
Direkt grafiler, 44 kV ve 3,2 mAs/s dozunda, standart bir röntgen cihazı (Multix-C, Siemens) kullanılarak elde edildi. Mesafe 100 cm olarak ayarlandı.

SONUÇLAR

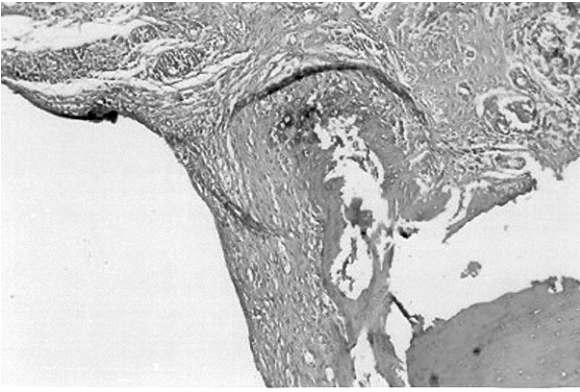
PHBV22 implantlarının hiçbiri yabancı cisim reaksiyonu göstermedi. Grup 1'deki birim alan başına düşen fibrokartilajinöz kallus ve yeni oluşan kemik lamellerinin, Grup 2'ye göre, daha fazla olduğu görüldü (Şekil 1). Ancak, Grup 2 spesimenlerinin belirgin



Şekil 1: 5 ng TGF β -1 içeren PHBV22 implantın histopatolojik görünümü. Yeni oluşmuş kemik lamellerin ve boşluğu dolduran fibrokartilajinöz kallusa dikkat ediniz (HE, 75X).



Şekil 2: 20 ng TGF β -1 içeren PHBV22 implantın histopatolojik görünümü. Matür kemik lamellerin düşük dozlu implanta göre daha fazla olduğu görülmektedir (HE, 40X).



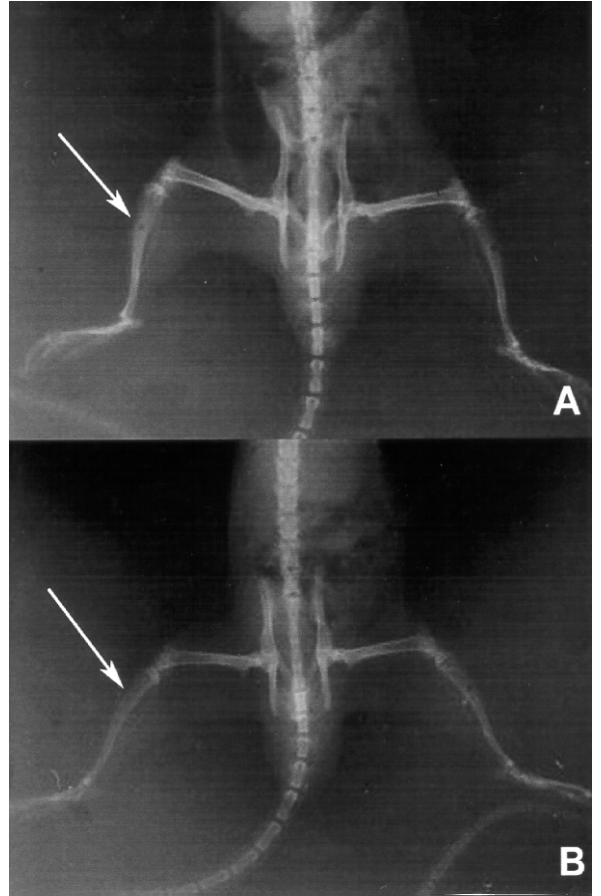
Şekil 3: TGF β -1 uygulanmayan kontrol spesimenlerinin en kötü histopatolojik iyileşme gösterdiği görülmektedir (HE, 40X).

derecede daha matür kemik lameller içerdiği tespit edildi. Bu bulgu, bu grupta iyileşmenin daha fazla tamamlanmış olduğu şeklinde yorumlandı (Şekil 2). Hem fantom implant kullanılan hem de Grup 3'teki (boş kontrol) defektlerin en kötü histopatolojik iyileşme gösterdiği görüldü (Şekil 3).

Radyolojik bulgular histopatolojik bulguları desteklemekteydi. Grup 1 ve 2'de tam iyileşme ve defektlerde kapanma gözlenirken, en kötü iyileşme kontrol gruplarında gözlemlendi. Grup 1'de süregelen ancak Grup 2'ye göre daha yavaş bir iyileşme olduğu görüldü. Kapanan defektlerde normal kemik iyileşmesi olduğu görüldü (Şekil 4A,B).

TARTIŞMA

TGF β -1 kemik iyileşmesinin erken safhalarında görev alan protein yapılı bir sinyal molekülüdür. Bu nedenle, herhangi bir kemik defektinin bulunduğu bir bölgenin bu madde açısından yüksek aktivite göstermesi doğaldır. Buna göre, uzamış etki ve aktiviteyi indükleyen



Şekil 4A: Grup 1: 5 ng TGF β -1 uygulanmış sıçan tibiasının radyolojik görünümü. Sağdaki tibia defekti Grup 2'ye göre daha yavaş bir iyileşme göstermiştir (beyaz ok), **B:** Grup 1: 20 ng TGF β -1 uygulanmış sıçan tibiasının radyolojik görünümü. Sağdaki tibia defekti tamamen kapanmıştır (beyaz ok) ve görünüm histopatolojik bulguları destekler niteliktedir.

bir yavaş salınım sisteminin iyileşme hızını etkilemesi de beklenmelidir. Bu sayede yeni kemik oluşumu ve yeniden yapılanma daha hızlı ve tam olacaktır. Bu fikir, biyolojik olarak yıkılabilir bir sistem olarak planlandığında, materyalin erozyonu ve bölgeden uzaklaştırılması sırasında yeni oluşan kemik ile yer değiştirecek ve sonuç olarak defekt hızlı bir şekilde kapanacaktır.

Sunulan bu çalışmada sıçanlarda iyileşmenin doza bağımlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Genel olarak, tedavi edilmemiş bir defektin tamamen kapanması için 4 hafta yeterli olamamaktadır. Bu yeni tedavi yaklaşımı ile, eğer yeterli miktarda ve sürede TGFβ-1 sağlanırsa, kapanmanın *in vivo* olarak gerçekleşmesinin mümkün olduğu gözlenmiştir. TGFβ-1'in, serbest olarak ve tekrarlayan uygulamalarda ve çok daha yüksek dozlarda, kemik iyileşmesine olan etkileri daha önce gösterilmiştir^{14,15}. Bu çalışmalar, bu sinyal proteininin osteojenik ve kondrojenik kapasitesini açıkça vurgulamaktadır. Çalışmamızda uygun bir taşıyıcı sistemle ve çok az dozlarla (20 ng), birkaç mikrogram gibi yüksek dozlarla TGFβ-1 uygulanan diğer çalışmalara^{1,14,15} göre, çok daha iyi sonuçlar elde edilebileceği gösterilmiştir. Elde edilen sonucun, daha önce de bahsedilen implantın piezoelektrik özelliklerinin, TGFβ-1 sinyal molekülünün daha stabil ve uzun aktivitesiyle birleşmesi sonucu elde edildiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bu tip bir taşıyıcı sistemin, kemik iyileşmesini iyi yönde etkileyen büyüme faktörlerinin kontrollü salınımını sağlayacak bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Buna ek olarak oldukça pahalı ve değerli olan bu proteinlerin gereksiz yere harcanmasını önleme gibi bir avantaja da sahiptir. Buna karşılık, bu tip bir sistemin insanlarda ve daha büyük defektlerde uygulanması için daha ileri ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Dr. Ahmet TERZİOĞLU

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi

II. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği

Ulucanlar Cad. 06340 Mamak, ANKARA

KAYNAKLAR

- Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C. Transforming growth factor b enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 64: 553, 1993.
- Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8: 565, 1993.
- Cammas S, Bear MM, Moine L, et al. Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *Int J Biol Macromol* 25: 273, 1999.
- Gursel I, Hasirci V. Properties and drug release behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) and various poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) copolymer microcapsules. *J Microencapsulation* 12: 185, 1995.
- Gursel I, Korkusuz F, Turesin F, Alaeddinoglu NG, Hasirci V. In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials* 22: 73, 2001.
- Gursel I, Yagmurlu MF, Korkusuz F, Hasirci V. In vitro antibiotic release from poly(hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods. *J Microencapsulation* 19: 153, 2002.
- Korkusuz F, Korkusuz P, Eksioğlu F, Gursel I, Hasirci V. In vivo response to biodegradable antibiotic release systems. *J Biomed Mater Res* 55: 217, 2001.
- Yagmurlu A, Barlas M, Gursel I, Gokcora IH. Reduction of injury induced peritoneal adhesions by continuous release of streptokinase from a drug delivery system. *Eur Surg Res* 35: 46, 2003.
- Gudemez E, Eksioğlu F, Korkusuz P, Asan E, Gursel I, Hasirci V. Chondroitin sulfate coated pHEMA membrane prevents adhesion in full-thickness tendon tears of rabbit. *J Hand Surg* 27: 293, 2002.
- Turesin F, Gursel I, Hasirci V. Biodegradable polyhydroxyalkanoate (PHA) implants for osteomyelitis therapy: *in vitro* antibiotic release. *J Biomater Polym Ed* 12: 195, 2001.
- Yagmurlu MF, Korkusuz F, Gursel I, Korkusuz P, Ors U, Hasirci V. Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: In vivo effectivity and biocompatibility in the treatment of implant related experimental osteomyelitis. *J Biomed Mater Res* 46: 494, 1999.
- Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, et al. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. *Ann Thorac Surg* 70: 140, 2000.
- Sodian R, Sperling JS, Martin DP, et al. Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 6: 183, 2000.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor b and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg* 73A: 1418, 1991.
- Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 21: 199, 1990.