



## KEMİK KIKIRDAK DOKU DEFİKTLERİNDE YENİ TASARLANMIŞ YAPI İSKELELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bora UZUN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Biomechanics, 35270, İzmir, Türkiye

**Özet:** Kemik dokusu organik ve inorganik bileşenlerden oluşan bir yapıdır. Kemik dokusunun kırılmasıyla ilgili sorunlar mevcuttur. Kırığın kaynaması ve rehabilitasyon süreci çeşitli nedenlerden dolayı uzun zaman almaktadır. Yan etkiler arasında kemik kırıklarının iyileşmesinde gecikme, kemiğin kaynamaması ve enfeksiyonlar yer alır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ortopedi cerrahlarını hücre tedavisi ve biyomateryallere yönlendirmiştir. Çalışmamızda kollajen, lif kabağı, PRP ve kondrosit (kıkırdak hücresi) içeren iskeleleri in vivo iyileşme açısından araştırdık. Çalışma rastgele 4 gruba ayrılan 12 adet tavşan üzerinde gerçekleştirildi. Tavşanlar implantasyondan 8 hafta sonra yüksek doz anestezi uygulanarak sakrifiye edildi. Ameliyatından sonra 8. haftada sakrifiye edilen hayvanlardan alınan numuneler üzerinde histolojik analiz yapıldı. Sonuçlarımız lif kabağı+PRP+kondrosit hücre içeren iskelelerinin biyoyoumlu olduğunu ve iyileştirme mühendisliğine mükemmel bir alternatif olduğunu gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Kemik-kıkırdak defektleri, Yapı iskeleleri, Lif kabağı

### Investigation of Newly Designed Scaffolds in Bone Cartilage Tissue Defects

**Abstract:** Bone tissue is a structure composed of organic and inorganic components. There are problems with the fracture of bone tissue. The fracture healing and rehabilitation are a long term processes for various reasons. Complications of bone fractures include delayed healing, bone nonunion, and infections. Studies conducted in recent years have directed orthopedic surgeons to cellular therapy and biomaterials. Our study investigated loofah, PRP, and chondrocyte (cartilage cell) scaffolds for in vivo healing. The study was carried out on rabbits randomly divided into 4 groups. Animals were sacrificed 8 weeks after implant surgery by applying high-dose anesthesia. Histological analyses were performed on samples from animals sacrificed in week 8 after implant surgery. Our results showed that loofah+PRP+chondrocyte cell scaffolds are biocompatible and an excellent alternative to remedial engineering.

**Keywords:** Bone-cartilage defects, Scaffolds, Loofah

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Biomechanics, 35270, İzmir, Türkiye

E mail: bora.uzun@deu.edu.tr (B. UZUN)

Bora UZUN <https://orcid.org/0000-0001-6638-1799>

Gönderi: 05 Haziran 2024

Received: June 05, 2024

Kabul: 08 Temmuz 2024

Accepted: July 08, 2024

Yayınlanma: 15 Temmuz 2024

Published: July 15, 2024

Cite as: Uzun B. 2024. Investigation of newly designed scaffolds in bone cartilage tissue defects. BSJ Eng Sci, 7(4): 752-755.

### 1. Giriş

Kırık iyileşmesinin gecikmesi veya kaynamaması tedavide zorlukları da beraberinde getirir (Göransson, 1993). Bu durum sıklıkla kronik fonksiyonel ve fizyolojik bozukluklara ve hastada strese yol açar (Uthgenannt ve ark., 2007). İyileşmede kan akımının miktarı ve periosttaki hasar önemlidir (Han ve ark., 2016; Suzuki ve ark., 2020). Birçok nedenden dolayı kırık iyileşmesinde gecikme (kaynamama) veya psödoartroz görülebilir. Literatürde bazı doku mühendisliği temelli çalışmalar mevcuttur; ancak kaynamama problemi olan vakaların tedavisinde alternatif bir tedavi sağlayabilecek, kemik dokusuna uygun biyomateryaller kullanılarak üretilmiş yeni bir kemik dokusu iskele tasarımının hem in vitro hem de in vivo olarak araştırılması ve kıkırdak hücrelerinin etkinliğinin araştırılması gerekmektedir (Liu ve ark., 2022). Literatürde kıkırdak hücre kökenini karşılaştıran doku mühendisliği çalışmaları sınırlıdır (Blázquez-Carmona ve ark., 2023). Son yıllarda doku mühendisliği tekniklerinin gelişmesiyle kök hücre tedavilerinin kemik rejenerasyonu amacıyla kullanıldığı

bilinmektedir (Alshammari ve ark., 2023). Çalışmalar kemik hücrelerinin içerdikleri enzimler nedeniyle kemik dokusunun iyileşmesine daha fazla katkı sağladığını göstermiştir (Liu ve ark., 2013; Li ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2019; Sakeena ve ark., 2023; Mito ve ark., 2023). Bu çalışmada, yeni tasarlanmış bir kemik iskelesi olarak lif kabağı kullanarak kıkırdak hücre tedavilerine yeni bir yaklaşım getirmek ve kıkırdak-kemik dokusu mühendisliğiyle üretilmiş iskeleleri kullanarak iyileşmede gecikme sorununu çözmek amaçlanmıştır.

### 2. Materyal ve Yöntem

Kontrol grupları olarak, lif kabağı+PRP ve kollajen+PRP tavşan kondillerine implante edildi. Karşılaştırmalı grup olarak ise, kollajen+PRP+kıkırdak hücresi ve lif kabağı+PRP+kıkırdak hücresi olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu.

1. Grup: Kollajen + PRP
2. Grup: Lif kabağı + PRP
3. Grup: Kollajen + PRP + Kıkırdak hücresi
4. Grup: Lif kabağı + PRP + Kıkırdak hücresi



Kollajen (SpongeCol, Sigma-Aldrich), PRP (Lando) üretici firmadan temin edilmiştir. Doğal lif kabağı satın alınmıştır. Lif kabağı veya kollajen numuneleri PRP solüsyon içine daldırılarak 24 saat boyunca PRP emdirilmiş, daha sonrada 370 °C'de 2 saat boyunca kurutulmuştur. Skafoldlar 2 mm çapında ve 2 mm kalınlığında oluşturulmuştur. Skafoldlar hücre ekimi yapılmadan önce etilen oksit kullanılarak sterilize edilmiştir. Skafold başına 5x10<sup>4</sup> hücre ekilerek 48 saat 370C' de inkübe edilmiş. Hazırlanan skafoldlar tavşanlara implante edilmiştir. Çalışma rastgele 4 gruba ayrılan 12 adet tavşan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her grup için ortalama ağırlıkları 350 gr olan üçer tavşan kullanılmıştır. Tavşanlar 10ml/kg Xylazine ve 50ml/kg ketamin ile anestezi edildi. 2cm lateral insizyondan sonra kondilde 4 mm kadar boşluk oluşturulup 2 mm boyutundaki skafoldlar defektli bölgeye implante edildi. Tavşanlar yaklaşık 8 hafta sonra yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi.

### 2.1. Doku Takibi Protokolü

Histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda dokular 48 saat fikse edildi. Fazla fiksatifin uzaklaştırılması için, fikse edilen dokular bir gece boyunca akarsu da bekletildi. Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60 °C etüvde gerçekleştirildi. Dokular, %70'den %96'ya artacak şekilde, etil alkol serilerinden 20'şer dakika geçirilerek dehidrasyon gerçekleştirildi. Daha sonra, aseton çözeltisiyle her biri 20 dakika süren dört işlem gördükten sonra, iki kez 30 dakika boyunca ksilolde bekletildi. 60 °C'lik etüvde, her biri bir saat süren iki kez parafin daldırma işlemi uygulanarak, dokular parafin blokların içine yerleştirildi. Döner (Rotary) mikrotom cihazı (RM 2255, Leica) yardımıyla 5 µ kalınlığında kesitler alındı.

### 2.2. Hematoksilen ve Eozin Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki etüvde diğer ikisi oda sıcaklığında 20'şer dakikalık sürelerle ksilole tabi tutuldu. Ardından, rehidratasyon işlemi için kesitler, 5 farklı azalan konsantrasyonlardaki alkol serilerinden (absolü - %70) geçirilerek, distile su ile çalkalandı. Daha sonra, 10 dakika boyunca Hematoksilen ile nükleusların boyanması sağlandı. Boyamanın ardından, fazla boyayı

uzaklaştırmak için kesitler 10 dakika boyunca akan su altında yıkandı ve 2 dakika boyunca Eozin ile boyanarak hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı. Boyama işleminden sonra, kesitler sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri absolü alkol ile işleme tabi tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla, kesitler üç kez 20'şer dakika ksilolde bekletildi ve ardından sentetik reçine (Entellan) ile kapatıldı."

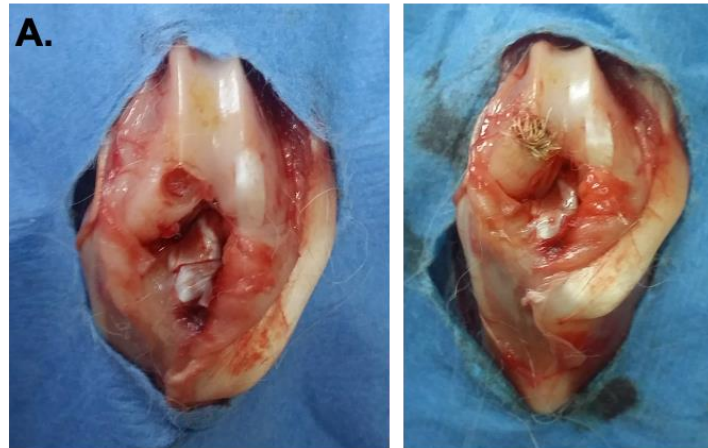
### 3. Bulgular

1. Grup (kollajen+PRP) ile 2. Grup (lif kabağı+PRP) karşılaştırıldığında iyileşmenin fibröz doku ve kırık doku karışımı olduğu gözlenmektedir. İyileşme alanında bağ dokunun yoğunlukta olduğu görülmektedir (Şekil 3). Fibröz doku ile birlikte kırık doku hücre grupları da iyileşme bölgesine katılmıştır. 2. Grupta (lif kabağı+PRP) ise iyileşme gözlenmemiş ancak az miktarda hasar yüzeyinde kırık doku hücre oluşumu izlenmiştir.

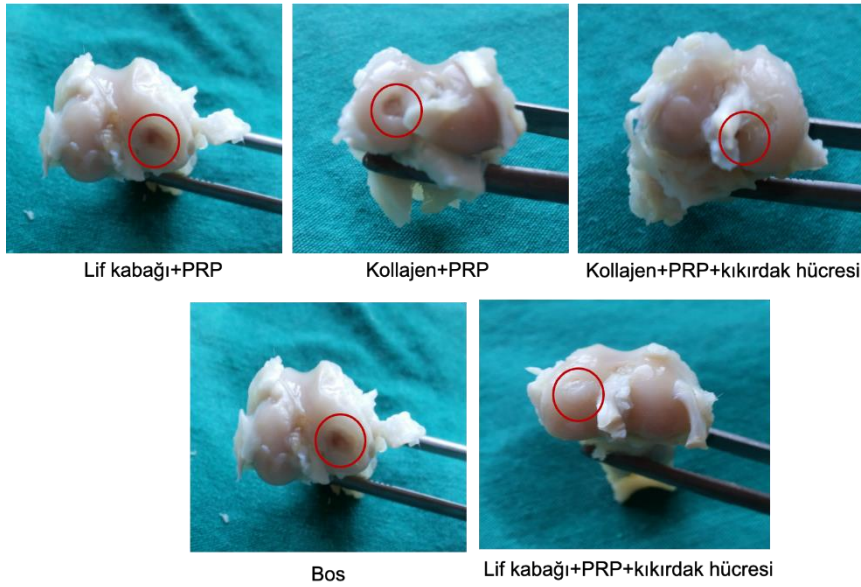
3. grup (kollajen+PRP+kırık doku hücresi ekilmiş grup) ile 4. grup (lif kabağı+PRP+kırık doku hücresi ekilmiş grup) karşılaştırıldığında 4. grupta iyileşme görülmüştür, yüzeyde kırık doku altında kemik doku ve vaskülarize yapıların oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 3).

1. Grup (kollajen+PRP) ile 3. grup (kollajen+PRP+kırık doku hücresi ekilmiş grup) karşılaştırıldığında, boş defekte hasarlı alanda herhangi bir iyileşme olmadığı ancak sadece boş defekt bölgesinde az miktarda yüzeysel düzgün bir fibröz doku varlığı görülmüştür. Fibröz dokunun yoğunlukta olduğu bölgede kırık doku hücrelerine rastlanmamıştır ve kemik dokuda herhangi bir iyileşme gözlenmemiştir.

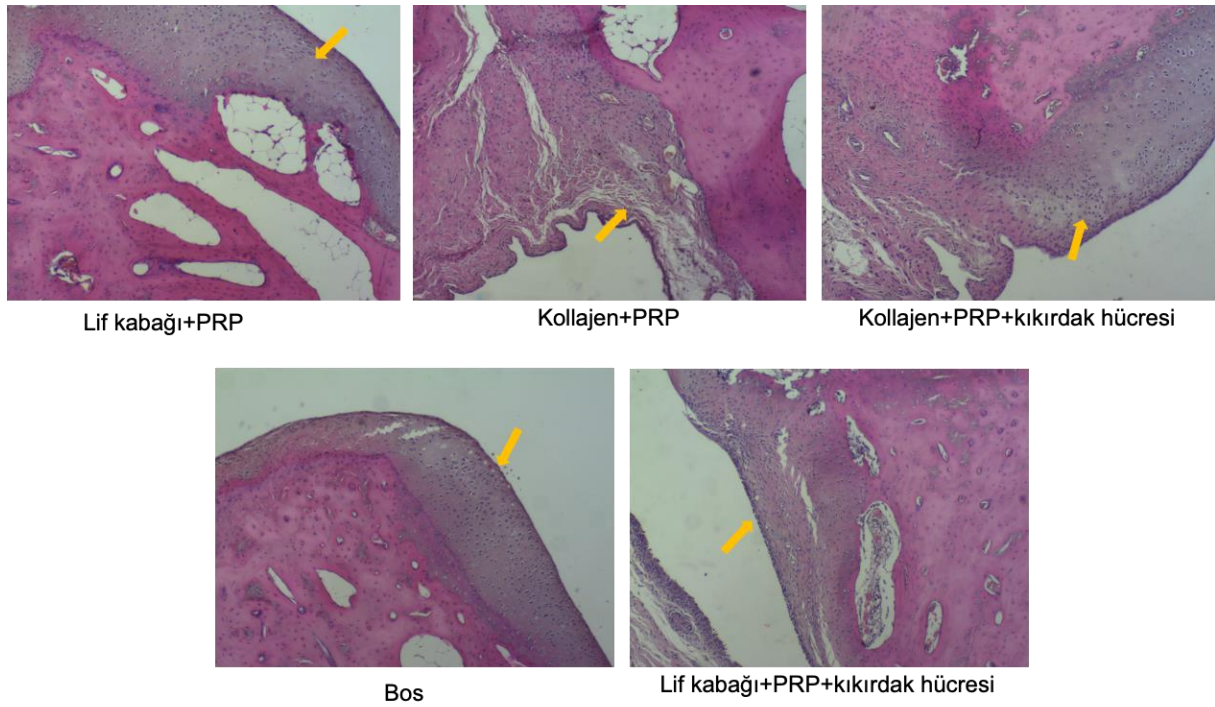
Çalışmamızda, histokimyasal incelemede 4. grup (lif kabağı+PRP+kırık doku hücresi ekilmiş grup) ile boş hasar bölgesinde irregüler bir iyileşme görülmüştür. 1. Grup (kollajen+PRP) , 3. grup (kollajen+PRP+kırık doku hücresi ekilmiş grup) ve 4. grup (lif kabağı+PRP+kırık doku hücresi ekilmiş grup) histokimyasal olarak değerlendirildiğinde, tüm gruplarda osteokondral kaynama olup, ekstraselüler matrikste gözlendi. 3. Grupta kırık defektinde hiperselüler bağ dokusu benzer şekilde gözlendi (Şekil 3). 4. Grupta ise ise diğer gruplara göre hiperselüler bağ dokusu yapısında artış izlendi ve kondrositlerin diğer gruplara göre daha fazla olduğu izlendi.



Şekil 1. Boş defekt ve Lif kabağı+PRP+kırık doku hücresi grubun implante görüntüsü.



Şekil 2. İmplantasyon sonrası (8. hafta) görüntüleri.



Şekil 3. Kondil kemik dokusunda Hematoksilen-Eozin boyama (40X büyütme). Sarı oklar kaynama dokusunu göstermektedir.

#### 4. Tartışma

Hastaların artan beklentileri nedeniyle kırık iyileşmesine yönelik deneysel ve klinik çalışmalar yoğunlaşmış; gerekli cerrahi veya konservatif tedavi uygulanarak ve hastanın erken mobilize edilmesiyle kırık iyileşmesinin mümkün olan en hızlı şekilde sağlanması önemlidir (Ramzan ve ark., 2023). İyi biyouyumlulukları ve mekanik bütünlükleri nedeniyle doku mühendisliği iskeleleri, osteokondral defektlerin onarımı ve rejenerasyonunda temel bir yöntem haline gelmiştir (Baysan ve ark., 2023; Yang ve ark., 2024). İçsel özelliklerini geliştirmek, dejeneratif süreçlerini kontrol etmek ve hücre yapışmasını ve farklılaşmasını arttırmak

için çok sayıda iskele mimarisi ve oluşum yöntemi geliştirilmiş ve test edilmiştir (Baysan ve ark., 2022; Peng ve ark., 2023), ancak ideal iskele tasarımı hala tartışmalıdır (Ding ve ark., 2023). Ayrıca iskele, histolojik fiksasyonu, implantasyon sonrası onarımı ve yenilenmeyi önemli ölçüde etkiler (Cao ve ark., 2023; Sun ve ark., 2023). Çalışmamız, tavşanların baskı yaparak hareket etmesini ve göreceli stabilizasyon sağlayarak normal günlük yaşama dönüşlerini kolaylaştırdı. Böylece tavşanlarda mikro harekete izin vererek, kırık kaynamasının sağlanması hedeflendi.



## 5. Sonuç

Doğal bir selüloz kaynağı olması ve hidrofilik özelliği sahip olması nedeniyle skaffold olarak lif kabağı tercih edilmiştir. Elde edilen doku iskeleleri bu açıdan uygun olup, kemik kırıldak doku mühendisliği alanında geliştirilen yapılarla aynı biyoyumlu özelliklere sahiptir. Doku iskeleleri için toksik özellik göstermemiş ve hücrelerin çoğalmasını olumlu yönde etkilemiştir. Geliştirilen bu doku iskeleleri, hücrelerle birlikte klinik ortamda saklanması yoluyla ticari olarak da kullanılabilir.

## Katkı Oranı Beyanı

Yazarın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Yazar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	B.U.
K	100
T	100
Y	100
VTI	100
VAY	100
KT	100
YZ	100
KI	100
GR	100
PY	100
FA	100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

## Çatışma Beyanı

Yazar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedir.

## Etik Onay Beyanı

Bu araştırmada hayvanlar kullanıldığı için Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (onay tarihi: 01 Mayıs 2016, onay numarası: 2016-05) onayı alınmıştır.

## Kaynaklar

Alshammari A, Alabdah F, Wang W, Cooper G. 2023. Virtual design of 3D-printed bone tissue engineered scaffold shape using mechanobiological modeling: Relationship of scaffold pore architecture to bone tissue formation. *Polymers*, 15(19): 3918.

Baysan G, Colpankan Gunes O, Akokay P, Husemoglu RB, Ertugruloglu P, Ziyilan Albayrak A, Havitcioglu H. 2022. Loofah-chitosan and poly (-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) based hydrogel scaffolds for meniscus tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*, 221: 1171-1183.

Baysan G, Gunes O C, Turemis C, Akokay Yilmaz P, Husemoglu R B, Kara Ozenler A, Cecen B. 2023. Using loofah reinforced chitosan-collagen hydrogel based scaffolds in-vitro and in-

vivo; healing in cartilage tissue defects. *Materialia*, 31: 101881.

Blazquez-Carmona P, Mora-Macías J, Martínez-Vázquez FJ, Morgaz J, Domínguez J, Reina-Romo E. 2023. Mechanics predicts effective critical-size bone regeneration using 3d-printed bioceramic scaffolds. *Tissue Eng Regen Med*, 20(6): 893-904.

Cao Y, Zhang H, Qiu M, Zheng Y, Shi X, Yang J. 2023. Biomimetic injectable and bilayered hydrogel scaffold based on collagen and chondroitin sulfate for the repair of osteochondral defects. *Int J Biol Macromol*, 257(Pt 1):128593.

Ding Q, Zhang S, Liu X, Zhao Y, Yang J, Chai G, Ding C. 2023. Hydrogel Tissue Bioengineered Scaffolds in Bone Repair: A Review. *Molecules*, 28(20): 7039.

Göransson H. 1993. Callus formation after re-injury to experimental bone defect. *Arch Orthop Trauma Surg*, 112(5): 232-235.

Han W, He W, Yang W, Li J, Yang Z, Lu X, Qian Y. 2016. The osteogenic potential of human bone callus. *Sci Rep*, 6(1): 36330.

Li H, Hu C, Yu H, Chen C. 2018. Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: A review. *RSC Adv*, 8(7): 3736-3749.

Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, Xiang Z. 2013. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics*, 36(11): 868-873.

Liu Q, Liu Z, Guo H, Liang J, Zhang Y. 2022. The progress in quantitative evaluation of callus during distraction osteogenesis. *BMC Musculoskeletal Disord*, 23(1): 490.

Mito K, Lachnish J, Le W, Chan C, Chang Y L, Yao J 2023. Scaffold-Free Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheets Enhance Bone Formation in a Weight-Bearing Rat Critical Bone Defect Model. *Tissue Eng Part A*, 30(3-4):107-114.

Peng Y, Zhuang Y, Liu Y, Le H, Li D, Zhang M, Ding J. 2023. Bioinspired gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering. *Exploration*, 3: 20210043.

Ramzan F, Salim A, Khan I. 2023. Osteochondral tissue engineering dilemma: Scaffolding trends in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep*, 19(6): 1615-1634.

Sakeena Q, Makhdoomi DM, Rather SA, Parrah JUD, Dar SH, Gugjoo MB. 2023. Radiographic evaluation of healing potential of stem cell-loaded scaffold in experimental bone defect. *SKUAST J Res*, 25(3): 506-510.

Sun J, Qin L, Wang D, Zhao H, Gong M, Dong X, Zhou W. 2023. Fabrication of novel printable artificial bone composites used as cartilage scaffolds by an additive manufacturing process. *J Appl Polym Sci*, 140(43): e54576.

Suzuki T, Matsuura Y, Yamazaki T, Akasaka T, Ozone E, Matsuyama Y, Ohtori S. 2020. Biomechanics of callus in the bone healing process, determined by specimen-specific finite element analysis. *Bone*, 132: 115212.

Uthgenannt BA, Kramer MH, Hwu JA, Wopenka B, Silva MJ. 2007. Skeletal self-repair: stress fracture healing by rapid formation and densification of woven bone. *J Bone Miner Res*, 22(10): 1548-1556.

Yang F, Li Y, Wang L, Che H, Zhang X, Jahr H, Wang J. 2024. Full-thickness osteochondral defect repair using a biodegradable bilayered scaffold of porous zinc and chondroitin sulfate hydrogel. *Bioact Mater*, 32: 400-414.

Zhang Y, Liu X, Zeng L, Zhang J, Zuo J, Zou J, Chen X. 2019. Polymer fiber scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Adv Funct Mater*, 29(36): 1903279.